Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. J. Mallach

Über geeignete mikrochemische Nachweismethoden von Medazepam (Nobrium®) als Voraussetzung für pharmakokinetische Untersuchungen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Erwin Kohler
aus Metzingen

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547603_0018

Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. J. Mallach

Über geeignete mikrochemische Nachweismethoden von Medazepam (Nobrium®) als Voraussetzung für pharmakokinetische Untersuchungen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Erwin Kohler
aus Metzingen

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. med. K. Mörike

Berichterstatter: Professor Dr. med. H.J. Mallach

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG • Tübingen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. H.J. Mallach, Direktor des Instituts für Gerichtliche Medizin der Universität Tübingen, für die Überlassung des Themas und die Ratschläge bei der Fertigstellung der Arbeit.

Herrn Diplom-Chemiker K. Besserer danke ich für die zahlreichen Anregungen bei der Einarbeitung in die chemisch-toxikologische Arbeitstechnik.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Dr.med.H.-J. Mittmeyer für die Beratung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
A) Gerichtsmedizinische Gesichtspunkte	1
B) Eigenschaften und Wirkungen der Benzodiazepine	2
C) Chemische und physikalische Eigenschaften sowie die Nachweisverfahren	5
D) Problemstellung	11
II. Eigene Untersuchungen	12
A) Chromatographisches Verhalten	12
a) Papierchromatographie	12
b) Dünnschichtchromatographie	12
B) Lichtabsorption im ultravioletten und sichtbaren Bereich	15
C) Infrarotspektrum	17
D) Schmelzpunkt-Bestimmung	17
E) Untersuchungen zur Erfassung kleinster Medazepam-Mengen	19
1. Aufstellung der Eichkurven	19
a) statistische Formeln	22
b) Eichkurve im neutralen Milieu	23
c) Eichkurve im sauren Milieu	23
2. Hydrolyse-Versuche	26
a) mit Salzsäure	26
b) mit Schwefelsäure	27
c) mit Wasserstoffperoxyd	27
3. Dünnschichtchromatographische Versuche	28
a) punktförmige Dünnschichtchromatographie	28
b) präparative Dünnschichtchromatographie	28
4. Extraktionsversuche	29
5. Serumzusatzversuche	30
a) Extraktionsversuche mit Äther	30
b) Extraktionsversuche mit Chloroform	31

c) Extraktionsversuche nach Serumfällung mit Perchlorsäure 32
d) Aufstellung der Eichkurven 32

6. Dünnschichtchromatographie nach Serumextraktion 36

F) Pharmakokinetik 39
1. Versuchsmodell 39
a) 1. Hauptversuch 39
b) 2. Hauptversuch 40
c) 3. Hauptversuch 40

2. Bestimmung der Medazepam-Konzentrationen in Seren 40
a) spektrophotometrische Bestimmungen (Reextraktionsmethode) 40
b) Dünnschichtchromatographische Bestimmungen 41

3. Beurteilung der Versuche 43
a) 1. Hauptversuch 43
b) 2. Hauptversuch 44
c) 3. Hauptversuch 45

III. DISKUSSION 52

IV. ZUSAMMENFASSUNG 58

V. LITERATURVERZEICHNIS 59

I. EINLEITUNG

A) Gerichtsmedizinische Gesichtspunkte

Kennzeichnend für die moderne Medizin ist unter anderem ein ungeheurer Anstieg der Arzneimittelproduktion und des Arzneimittelkonsums. Maßgeblichen Anteil an dieser Entwicklung hat, vor allem in den letzten 20 Jahren, die Stoffgruppe der Psychopharmaka gewonnen, die für den Gerichtsarzt besonders interessant geworden ist. Im Index psychopharmacorum berichtet PÖLDINGER (1966) von 556 psychotropen Substanzen; 1966 nennt LABHARD sogar über 2000 Stoffe dieser Gruppe.

Für den Gerichtsmediziner sind Psychopharmaka unter vielerlei Gesichtspunkten, zunächst aber in verkehrsmedizinischer Hinsicht, wichtig: So berichtete WAGNER (1963), daß von 5000 Kraftfahrern, die durch menschliches Versagen einen Unfall verursacht hatten, 10 - 12 % innerhalb der letzten 24 Stunden ein Medikament eingenommen hatten. PRIBILLA (1965) wies auf ein rasches Ansteigen der Fälle mit Angaben von Arzneimitteleinnahme bei Verkehrsunfällen im Laufe der letzten Jahre hin. DORN und Mitarbeiter (1970) konnten diese Entwicklung bestätigen.

Häufig wird im Zusammenhang mit Alkoholdelikten von einem "Potenzierungseffekt" der Alkohol - Medikamentenwirkung gesprochen. MALLACH (1969) stellte dagegen fest, daß die Auswirkung stets eine Funktion der kombinierten Dosen ist. Deshalb spricht man besser von einem positiven oder negativen Synergismus (LOEWE, 1953). So konnten BURGER (1962), DITT (1964) und PRIBILLA (1964) über einen positiven synergistischen Effekt, d.h. eine erhebliche Leistungsminderung, bei der kombinierten Alkohol-Chlordiazepoxid-Wirkung berichten. Im Gegensatz dazu beobachtete SCHWEITZER (1967) eine signifikante Steigerung der Wahrnehmungsleistung nach Gaben kleiner Dosen von Diazepam und Alkohol.

Mit steigendem Arzneimittelverbrauch - auch durch aktive Teilnehmer am öffentlichen Straßenverkehr - nehmen die Schutzbehauptungen strafrechtlich verfolgter Personen zu. Diese Personen bringen häufig vor, sie hätten - gleich aus welchen Gründen - Arzneimittel eingenommen und wären durch die Wirkung dieser Mittel in ihrer Steuerungsfähigkeit beeinträchtigt worden. Um zu einer objektiven Beurteilung zu kommen, ist es daher unerläßlich, mikrochemische Nachweise zu entwickeln und pharmakokinetische Studien anzustellen.

B) Eigenschaften und Wirkungen der Benzodiazepine

Zu den Psychopharmaka im engeren Sinne zählen Neuroleptica, Tranquilizer, Antidepressiva und Psycholytica, im Gegensatz zu den Hypnotica, Antiepileptica und Psychotonica (PÖLDINGER, 1966). Hier soll jedoch aus der Gruppe der Tranquilizer (auch Ataractica, von "ataraxia" =Seelenruhe, genannt) nur die Untergruppe der Benzodiazepine betrachtet werden.

Als erstes Pharmakon dieser Gruppe wurde Chlordiazepoxid (Librium) von STERNBACH synthetisiert und 1960 in den Handel gebracht. Ihm folgten Diazepam (Valium), Oxazepam (Adumbran), Nitrazepam (Mogadan) und Anfang 1969 das Medazepam (Nobrium). Gemeinsam ist ihnen der sedierende, angst- und spannungslösende Effekt, wobei die große Spanne zwischen sedierender und hypnotischer Wirkung geradezu charakteristisch ist, ebenso der verschieden stark ausgeprägte Effekt der Muskelrelaxation, das Fehlen antidepressiver und antipsychotischer sowie kataleptischer und extrapyramidaler Eigenschaften (DEGKWITZ, 1967). Während Diazepam neben seiner sedierenden auch durch seine ausgeprägten muskelrelaxierenden und antikonvulsiven Eigenschaften charakterisiert ist, steht bei Nitrazepam der hypnogene Effekt im Vordergrund.

Als Angriffspunkt für die psychotrope Wirkung gilt das limbische System, dem eine wichtige Aufgabe in der Regulation psychosomatischer Vorgänge zukommt; es gilt sogar als Zentralstelle der Affektgestaltung, der Emotionen und der vegetativen Funktionen (AKERT und HUMMEL, 1963). Mac LEAN (1955) sprach sogar vom "visceralen Gehirn".

Die auch als "limbische Blocker" (BIRKMAYER, 1966) bezeichneten Benzodiazepine eignen sich besonders gut zur ambulanten Behandlung von Psychoneurosen, vegetativer Labilität, Aktualkonflikten, Angstzuständen und psychogener Schlaflosigkeit. Durch Afferenzblockade limbischer und thalamischer Bezirke kann der physiologische Einschlafmechanismus ungestört ablaufen. Wegen dieser bahnenden Wirkung auf den Schlafrhythmus hat MUNOZ (1965) für diese Gruppe der Tranquilizer die Bezeichnung E u h y p n i c a vorgeschlagen. Denn selbst bei hoher Dosierung tritt hier - im Gegensatz zu den Hypnotika - keine narkotische Wirkung ein; der Patient kann jederzeit aus dem Schlaf geweckt werden. Da auch die therapeutische Breite der Benzodiazepine ungewöhnlich groß ist, sind sie weit verbreitet und von großer Bedeutung in der ambulanten Behandlung psychosomatischer Erkrankungen. Die häufigsten Nebenwirkungen sind Müdigkeit und bei höherer Dosis Ataxie; sie sind dosisabhängig und schwinden bei Reduzierung der Dosis prompt (GORDON, 1964).

Seit etwa einem Jahr ist ein neues Medikament der Benzodiazepinreihe in die Therapie eingeführt: das M e d a z e p a m (Nobrium). Es nimmt eine Sonderstellung durch seine ausgeprägte angst- und spannungslösende Wirkung ein, ohne dabei die geistige und körperliche Aktivität zu dämpfen und die Vigilität zu beeinflussen.

In Tierexperimenten zeigte Medazepam, ursprünglich als Ro 5-4556 bezeichnet, eine tranquilisierende Wirkung bei Katzen und Affen, muskelrelaxierende sowie schwache antikonvulsive und sedierende Eigenschaften bei Ratten, Mäusen und Katzen. Anhand elektrophy-

siologischer Untersuchungen an Katzen konnte demonstriert werden, daß die Aktivität der Formatio reticularis von Medazepam unbeeinflußt bleibt, während hypothalamische Bezirke und die Amygdala in ihrer Aktivität gehemmt wurden (RANDALL und Mitarbeiter, 1968).

HEINEMANN und Mitarbeiter konnten 1968 bei ihren Versuchen über den Einfluß von Medazepam auf die Schlaf-Wach-Regulation bei Katzen einen schlafinduzierenden Effekt der Substanz, eine Vermehrung der Tiefschlafphasen und vor allem eine fördernde Wirkung auf den desynchronisierten Schlaf beobachten.

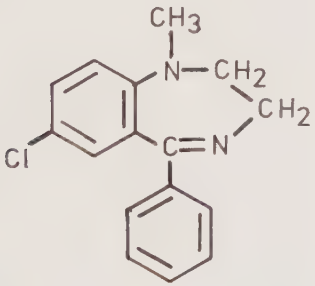
Inzwischen liegen eine Reihe von Berichten über Erfahrungen in klinischer und ambulanter Behandlung mit Medazepam vor. KRAKOWSKI (1967) sowie BERGENER und Mitarbeiter (1968) konnten in Doppelblindversuchen die eindeutige Oberlegenheit des Medikamentes gegenüber Placebos beweisen. Bei Dosen von 10 - 60 mg/die zeigte Medazepam in klinischen und ambulanten Tests an einer großen Zahl von Patienten gute anxiolytische Eigenschaften bei schwacher Sedation - ohne wesentliche Nebenwirkungen (GOLDSTEIN, 1967; SCHOPBACH, 1967; FRANKE, 1968; REIMER 1968; SPIEGELBERG, 1968). SPIEGELBERG sprach sogar von einem dem idealen Tagestranquilizer nahekommenden Medikament. Sowohl in der Gerontopsychiatrie (BERGENER, 1968) als auch in der Pädiatrie zur Behandlung retardierter und emotionell gestörter Kinder (UCER, 1968) konnte Medazepam erfolgreich angewandt werden.

Über bessere Behandlungsergebnisse mit Medazepam als mit verwandten Substanzen konnten MOUTINHO (1968) sowie ARMANDO und Mitarbeiter (1968) bei der Therapie von Angst-, Unruhe- und Spannungszuständen berichten. Kranke, deren Leitsymptomatik durch Abgeschlagenheit, vegetative Störungen sowie funktionelle Herz-, Magen- und Darmbeschwerden bestimmt war, sprachen gut auf das Präparat an (MADALENA, 1967; MEUSERT, 1968). Teilweise konnten sogar organmanifeste Affektionen wie Magen- oder Duodenalulcera, die sehr häufig von psychovegetativen Symptomen begleitet sind, günstig beeinflußt oder geheilt werden (CLAUDE und Mitarbeiter, 1968; VENHOFEN und WEISS, 1968).

Bei EEG-Untersuchungen an Patienten, die unter Medazepam-medikation standen, wurden dieselben Veränderungen gefunden wie bei Chlordiazepoxid, Diazepam und Nitrazepam: eine Verminderung der Amplitude und gleichzeitige Beschleunigung des α-Rhythmus sowie eine Reduktion paroxysmaler Veränderungen (BERG und FLEGEL, 1969). Somatische Nebenwirkungen wurden von keinem der genannten Autoren beobachtet, ebenso keine Gewöhnungs- oder Abhängigkeitserscheinungen (LEUBE, 1968).

C) Chemische und physikalische Eigenschaften von Medazepam sowie die Nachweisverfahren

Der Wirkstoff von Medazepam hat die chemische Bezeichnung 7-Chlor-2,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-1H-1,4benzodiazepin und folgende Strukturformel:



Die Base ist löslich in Aceton, Äther, Benzol, Chloroform, Eisessig (orange Färbung), Essigsäureäthylester, n-Hexan und Methanol, unlöslich jedoch in Wasser bei 20 °C.

Die Substanz hat ein Molekulargewicht von 270,77, ist kristallin, geschmack- und geruchlos und von gelber Farbe. Untersuchungen über den Metabolismus von Medazepam wurden von RIEDER und RENTSCH 1968 mit radioaktiv markiertem ^{14}C durchgeführt.

Das in Abbildung 1 folgende Formelschema soll die Transformation im Stoffwechsel des Menschen knapp skizzieren:

Abb. 1

Charakteristika von Medazepam und seiner Derivate sind nach RIEDER und RENTSCH (1968): Alle Substanzen absorbieren kurzwelliges UV-Licht und bewirken daher bei Anwesenheit in ausreichender Menge auf Dünnschichtplatten mit fluoreszierender Schicht Fluoreszenzlöschung. Nur Metabolit VIII fluoresziert spontan. Die Metaboliten II, IV, VI, VII, XI erscheinen bei Tageslicht gelb gefärbt. Die Derivate VII und XI zeigen mit den BRATTON-MARSHALL-Reagenzien (Diazotierung) sofort Rotfärbung, während die Substanzen IV, V, VI, IX, X erst nach Säurehydrolyse eine positive BRATTON-MARSHALL-Reaktion ergeben.

Zur Bestimmung der Benzodiazepine wurden zahlreiche analytische Methoden beschrieben; und zwar dünnschicht- und papierchromatographische, spektrophoto- und spektrofluorimetrische, polarographische und gaschromatographische.

Über systematische Versuche zur dünnschicht- und papierchromatographischen Trennung von Arzneimitteln und speziell psychotroper Substanzen berichteten COCHIN und Mitarbeiter (1963), PAULUS und Mitarbeiter (1963), MACEK und Mitarbeiter (1965) sowie LAUFFER und Mitarbeiter (1969). SMYTH und Mitarbeiter (1963) stellten in einer Arbeit Identifizierungsreaktionen von Chlordiazepoxid zusammen.

Die meisten Autoren entwickelten Verfahren, in denen die Benzodiazepine über ihre Hydrolysenprodukte 2-Amino-5-Chlorbenzophenon (ACB) oder 1-Methylamino-5-Chlorbenzophenon (MACB), die bei Öffnung des Diazepinringes entstehen, bestimmt werden. Von Vorteil ist, daß das Hydrolysenprodukt stabiler und durch empfindlichere Reaktionen nachweisbar ist, und daß alle im Körper entstehenden Metaboliten, wie etwa beim Chlordiazepoxid, in das Hydrolysat überführt werden können.

Im Prinzip gingen die meisten Untersucher so vor, daß sie in alkalischem Milieu extrahierten - wobei die Extraktionsbedingungen bei den verschiedenen Autoren variierten - , dann im stark sauren Bereich hydrolysierten und schließlich die Substanzen dünnschichtchromatographisch oder spektrophotometrisch identifizierten. Die Identifizierung erfolgte über Diazotierung des Hydrolysats und Kupplung zu einem Azofarbstoff (Reaktion nach BRATTON und MARSHALL 1939).

Durch die Diazotierbarkeit des 2-Amino-5-chlorbenzophenon - 1-Methylamino-5-chlorbenzophenon besitzt aufgrund seiner N-1-Methylierung diese Eigenschaft nicht - , war eine empfindliche Nachweismöglichkeit der Benzodiazepine gefunden. Durch Kupplung mit N-(1Naphthyl)-äthylen-diamindihydrochlorid (SMYTH und Mitarbeiter, 1963; KOECHLIN und Mitarbeiter, 1963; PRIBILLA, 1964, 1965; RIEDER, 1965; BEYER und Mitarbeiter, 1969; KAMM und Mitarbeiter, 1969) wird die Nachweisbarkeit empfindlicher als mit alkalischer α- bzw. β -Naphtholösung (BÄUMLER und RIPPSTEIN, 1961; PRIBILLA, 1964; PELZER , 1969).

Bei milder Hydrolyse - bei pH 7,5 durch Zusatz von Diäthanolamin - , wird Chlordiazepoxid quantitativ durch Abspaltung der basischen Methylamino-Gruppe in sein Lactam überführt. In alkalischer Lösung zeigt die Substanz unter Lichteinfluß fluoreszierende Eigenschaften, die quantitativ spektrofluorometrisch ausgewertet werden können (KOECHLIN, 1963).

Über ein weiteres analytisches Verfahren, den polarographischen Nachweis von Chlordiazepoxid und Nitrazepam, konnten OELSCHLAEGER und Mitarbeiter 1963 und 1966 berichten. Auch gaschromatographische Bestimmungen der Benzodiazepine wurden inzwischen von einigen Autoren durchgeführt (KAZYAK und Mitarbeiter, 1963; De SILVA und Mitarbeiter, 1964; Mc.MARTIN und Mitarbeiter, 1966; SCHWARTZ und Mitarbeiter, 1966; VIGNOLI und Mitarbeiter, 1966; JAIN und Mitarbeiter, 1967; THOMPSON und Mitarbeiter, 1968).

Außer den Angaben von RIEDER und RENTSCH (1968), die radioaktiv markiertes ^{14}C zur scintillometrischen Messung verwendeten, sind bisher zum Nachweis von Medazepam aus biologischem Material nur zwei Hinweise erschienen. LAUFFER und SCHMID (1969) bestimmten Medazepam mit einer dünnschichtchromatographisch-spektrofluorometrischen Methode und CANO (1969) berichtete über Möglichkeiten spektrophotometrischer, dünnschicht- und gaschromatographischer Erfassung von 7-Chlor-2,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-1 H-1,4-benzodiazepin (Medazepam).

Bei ihren Versuch mit radioaktiv markiertem ^{14}C extrahierten RIEDER und RENTSCH wie folgt: Zu 0,2 - 0,5 ml Plasma wurden gleiches Volumen destilliertes Wasser sowie drei Volumanteile 1 m Borat-Puffer von pH9 zugesetzt und zweimal mit 10 Volumanteilen Diäthyläther extrahiert.

LAUFFER und SCHMID setzten zu 3 ml Plasma 9 ml Glycocoll-Puffer (pH9) zu und extrahierten dreimal mit 36 ml Äther. Die vereinigten Ätherextrakte wurden mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft, der Rückstand in 1 ml Äthanol aufgenommen, davon 150 µl Äthanol dünnschichtchromatographisch aufgetragen und - nach Ansprühen mit Orthophosphorsäure und Vorbehandlung mit 0,1 n Salzsäure - Fluoreszenzspektren mit Hilfe des Dünnschicht-Scanner gemessen.

CANO extrahierte bei pH 9 mit Äther (4 ml Plasma wurden mit 4 ml tampon Merck versetzt), reextrahierte mit 2 n Salzsäure und schüttelte den Extrakt nach Zugabe von Natronlauge bis zum Umschlagspunkt von Thymolblau zweimal mit n-Hexan aus. Nach Einengung zur Trockene und Lösung in definierten Hexan-Mengen kann der Extrakt sowohl zur spektrophotometrischen als auch zur dünnschicht- und gaschromatographischen Messung verwendet werden.

D) Problemstellung

Aufgabe der vorgelegten Arbeit sollte die Prüfung einzelner oben erwähnter Nachweismethoden und gegebenenfalls deren Weiterentwicklung für die Bestimmung von Blutspiegelkurven sein; denn diese sind im Hinblick auf die Wechselwirkung zwischen Medazepam und Alkohol Voraussetzung für die Zuordnung der Auswirkungen auf die psychophysische Leistungsfähigkeit.

II. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A) Chromatographisches Verhalten

a) Papierchromatographie

Die methanolische Lösung der Medazepam-Base wurde im aufsteigenden Verfahren auf Schleicher & Schüll-Papier Nr. 2045 b MGC chromatographiert. Als Fließmittel wurde

1. das von ALGERI und WALKER (1952) beschriebene n-Butanol, gesättigt mit 5 n Ammoniak,
2. n-Butanol, gesättigt mit Ameisensäure

verwendet.
Die Laufzeit betrug jeweils 14 Stunden. Während mit dem ersten Fließmittel die Base mit der Lösungsmittelfront lief, zeigte sie bei der Verwendung des zweiten Fließmittels einen rf-Wert von 0,9.

Nachweisbarkeit
Bei Betrachtung der Chromatogramme im UV-Licht (254 nm) war der Substanzfleck nur schwach zu erkennen. Nach Besprühen der Substanzflecke mit Muniers Reagens trat eine intensive Orange-Färbung ein.

b) Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtplatten wurden mit Hilfe des Streichgerätes der Firma Desaga (Heidelberg) mit Kieselgel HF 254 (Merck) in einer Schichtdicke von etwa 0,25 mm belegt.

Als Fließmittel wurden geprüft:

Methanol-Ammoniak	99/1	R_F-Wert: ~ 0,8
Chloroform/Methanol	95/5	R_F-Wert: ~ 0,9
Chloroform/Methanol	9/1	R_F-Wert: ~ 0,55
Benzol/Dioxan/Eisessig	90/25/4	R_F-Wert: ~ 0,65 (Substanzflecke jedoch breit verwaschen)
Essigsäureäthylester		R_F-Wert: ~ 0,7
Chloroform/Aceton	9/1	R_F-Wert: ~ 0,6

In der Literatur wurden folgende Fließmittel angegeben:

CANO (1969):	Toluol/Aceton / konz.Ammoniak	(65/35/1)
	Dichlormethan/Methanol/konz.Ammoniak	(95/5/1)
	Heptan/Aceton/konz.Ammoniak	(65/35/1)
LAUFFER und SCHMID (1969):		
	Cyclohexan/Diäthylamin/Benzol	(80/15/5)
	Chloroform/Aceton/Methanol	(70/25/5)
RIEDER und RENTSCH (1969):		
	n-Heptan/Chloroform/Äthanol	(10/10/1)
	n-Heptan /Chloroform/Eisessig/Äthanol	(5/5/1/0,3)
	Isopropanol/konz.Ammoniak	(20/1)
	n-Heptan/Äthylacetat/Äthanol/konz. Ammoniak	(5/5/1/0,5)
	Chloroform/Aceton	(9/1)

Die Laufstrecke bei den eigenen Versuchen betrug in den verschiedenen Fließmitteln zwischen 10 und 15 cm. Die Substanzflecke wurden 1 cm vom seitlichen und 2 cm vom unteren Rand der Dünnschichtplatten aufgetragen.

Nachweisbarkeit

Die trockenen Dünnschichtplatten wurden im UV-Licht (254 nm) betrachtet. Die Medazepam-Reinsubstanz zeigte dabei Fluoreszenzlöschung bis zu einer Nachweisbarkeitsgrenze von 0,2 gamma. Nach etwa 36 Stunden zeigte die Substanz bei Betrachtung im UV-Licht von 366 nm intensive Fluoreszenz. Die Nachweisbarkeitsgrenze lag bei 0,1 gamma. Nach Ansprühen mit 50%iger Perchlorsäure trat die Fluoreszenz sofort auf.

Die Anfärbbarkeit ergibt sich aus Tabelle 1.

Tabelle 1

Reagenzien	Reaktion	Farbe	Nachweisbarkeitsgrenze
Muniers	+	orange	0,4 gamma
Jodplateat	+	dunkelblau-violett	0,4 gamma
$KMno_4$	+	hellgelbe Entfärbung auf rosa Grund	"
$FeCl_3$	ø	"	"
Ehrlichs-Reagens	ø	"	"
o-Dianisidin (nachdem die Platte 5 min.in der Chlorkammer stand und 5 min. an der Luft getrocknet wurde)	+	grauschwarz (in hohen Konzentrationen mit rötlichem Zentrum)	"

Da die Nachweisreaktionen, außer der mit Muniers Reagens oder Jodplateat, nicht sehr empfindlich sind und nur bei relativ hoher Substanzkonzentration positiv ausfallen, wurde deren Nachweisbarkeitsgrenze nicht bestimmt.

B) Lichtabsorption im ultravioletten und sichtbaren Bereich

Zur Messung der UV-Absorption und derjenigen im sichtbaren Bereich wurde das Beckman DK - 2A Spektrophotometer verwendet.

Die Medazepam-Base zeigte in sehr stark mit Wasser verdünnter methanolischer Lösung (99:1) charakteristische UV-Absorptionsspektren,

Milieu	Maximum	Minimum
neutral	248 nm	220 nm
sauer	252 nm	223 nm
basisch	330 nm (sehr flacher, nicht zu verwertender Gipfel)	300 nm

die in Abbildung 2 dargestellt sind.

Im sichtbaren Bereich fanden sich folgende Charakteristika:

Milieu	Maximum	Minimum
neutral	437 nm	·
sauer	450 nm	·
basisch in reiner methanolischer Lösung	·	·
	230 nm	306 nm
		218 nm

Abb. 2: UV-Absorptionskurven zweier im neutralen und sauren Milieu gemessenen Standardlösungen von Medazepam

C) Infrarot-Spektrum

Zur Charakterisierung der Reinsubstanz von Medazepam wurde das IR-Spektrum gemessen. Die Medazepam-Base wurde dabei mit der Apparatur der Firma Weber (Stuttgart) zu KBr-Preßlingen verarbeitet, im Beckman - IR5 - Spektralphotometer gemessen und das Spektrum in Abbildung 3 dargestellt.

D) Schmelzpunktbestimmung

Der Schmelzpunkt der Medazepam-Base wurde mit dem Kofler-Heiztischmikroskop bestimmt. Er lag zwischen 101°C und 103°C.

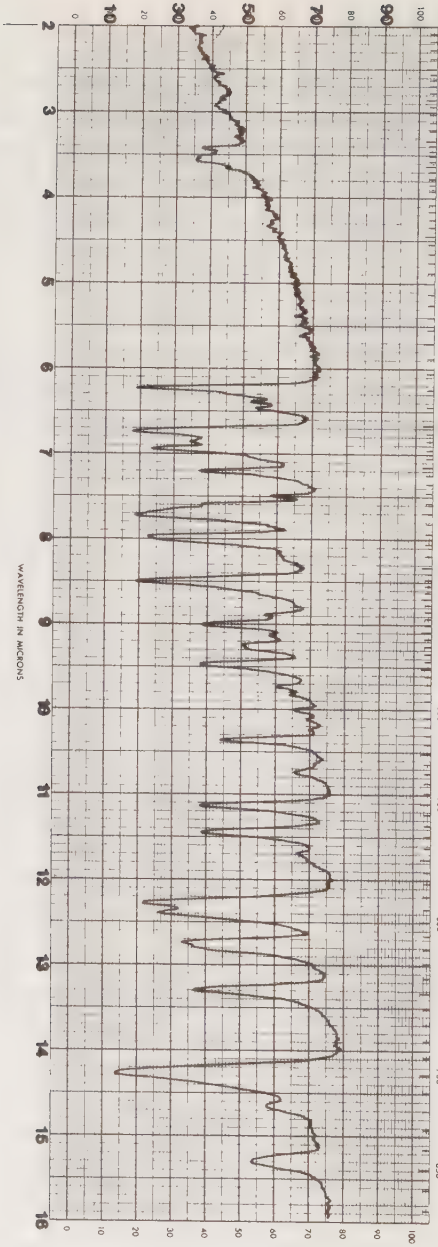


Abb. 3: IR-Spektrum von Medazepam

E) Untersuchungen zur Erfassung kleinster Medazepam-Mengen

1. Aufstellung der Eichkurven

100 mg Medazepam-Base wurden in 100 ml Methanol gelöst, sodaß sich 1 mg Substanz in 1 ml methanolischer Lösung befand. Aus dieser Stammlösung wurden jeweils 1, 0,9, 0,8 ... bis 0,1 ml in einen 100 ml Meßkolben pipettiert und mit destilliertem Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt. Es befanden sich also in den Meßkolben 10, 9, 8 ... bis 1 gamma Medazepam-Base in 1 ml Lösung. Diese Standardlösungen wurden nunmehr in einer Quarzküvette von 10 mm Schichtdicke im Beckman -Spektralphotometer gegen destilliertes Wasser gemessen.

Zunächst erfolgten die Messungen im neutralen Milieu, dann durch Zufügen von zwei Tropfen 10%iger Natronlauge im alkalischen und schließlich durch Zugabe von vier Tropfen konzentrierter Schwefelsäure im sauren Bereich. Auffällig dabei war, daß bei Verdünnung der methanolischen Lösung mit destilliertem Wasser der leicht gelbliche Farbton intensiver wurde. Bei Zugabe von Säure verfärbte sich die Lösung noch stärker gelb, während in alkalischem Milieu die Farbe verschwand.

Gemessen wurden insgesamt 100 Standardlösungen, davon jeweils 10 mit einem Gehalt von 1, 2, 3 ... bis 10 gamma Medazepam pro ml. Aus diesen Meßwerten wurden für den sauren und neutralen Bereich Eichkurven aufgestellt und diese in den Tabellen 2 und 3 dargestellt.

Tabelle 2: Extinktionswerte der im neutralen Bereich gemessenen Standardlösungen von Medazepam, Mittelwerte und Standardabweichungen

Zahl der Einzelmessungen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10 gamma/ml
1	0,080	0,150	0,220	0,300	0,345	0,420	0,490	0,560	0,620	0,680
2	0,070	0,170	0,230	0,310	0,365	0,430	0,500	0,605	0,580	0,675
3	0,090	0,160	0,235	0,280	0,350	0,425	0,480	0,540	0,610	0,690
4	0,085	0,160	0,240	0,300	0,360	0,405	0,505	0,605	0,660	0,700
5	0,080	0,170	0,250	0,300	0,370	0,450	0,580	0,635	0,615	0,760
6	0,090	0,160	0,245	0,325	0,385	0,450	0,525	0,560	0,680	0,735
7	0,055	0,140	0,200	0,285	0,370	0,400	0,470	0,530	0,670	0,700
8	0,110	0,190	0,260	0,345	0,410	0,485	0,550	0,615	0,650	0,725
9	0,095	0,185	0,260	0,350	0,400	0,460	0,510	0,600	0,670	0,700
10	0,060	0,185	0,205	0,280	0,360	0,420	0,490	0,560	0,650	0,735
y	0,815	1,670	2,345	3,075	3,715	4,345	5,100	5,810	6,405	7,100
$\bar{y}$	0,082	0,167	0,235	0,308	0,372	0,435	0,510	0,581	0,641	0,710
$s_y^{\pm}$	0,016	0,015	0,020	0,024	0,020	0,025	0,032	0,033	0,031	0,021

Tabelle 3: Extinktionswerte der im sauren Bereich gemessenen Standardlösungen von Medazepam, Mittelwerte und Standardabweichungen

Zahl der Einzelmessungen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	gamma/ml
1	0,065	0,150	0,240	0,320	0,425	0,485	0,560	0,670	0,765	0,810	
2	0,095	0,200	0,280	0,400	0,440	0,520	0,600	0,695	0,760	0,840	
3	0,120	0,205	0,285	0,390	0,455	0,530	0,620	0,700	0,790	0,860	
4	0,070	0,150	0,225	0,300	0,390	0,480	0,535	0,610	0,680	0,770	
5	0,095	0,175	0,255	0,340	0,420	0,500	0,580	0,640	0,740	0,805	
6	0,090	0,180	0,260	0,335	0,420	0,490	0,560	0,665	0,730	0,830	
7	0,090	0,175	0,260	0,330	0,395	0,480	0,560	0,675	0,730	0,780	
8	0,095	0,180	0,260	0,330	0,415	0,510	0,570	0,660	0,750	0,810	
9	0,080	0,170	0,260	0,335	0,400	0,485	0,570	0,660	0,685	0,755	
10	0,090	0,165	0,240	0,315	0,385	0,470	0,550	0,625	0,700	0,750	
y	0,890	1,750	2,565	3,395	4,145	4,950	5,705	6,600	7,330	8,010	
$\bar{y}$	0,089	0,175	0,257	0,340	0,415	0,495	0,571	0,660	0,733	0,801	
s_y ±	0,014	0,017	0,017	0,029	0,021	0,018	0,023	0,027	0,034	0,035	

a) Statistische Formeln

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse waren Durchschnittswerte und Standardabweichungen erforderlich. Außerdem mußten Regressionsgeraden und die Standardabweichungen der Regressionsgeraden ermittelt werden. FREUDENBERG (1962) und DOERFEL (1962) verwendeten zu diesen Berechnungen folgende Formeln:

1. Durchschnittswert:

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{N}$$

2. Standardabweichung:

$$s = \sqrt{\frac{\sum x^2}{N} - \bar{x}^2} \cdot \frac{N}{N-1}$$

3. Regressionsgerade:

$$y = a + bx$$

$$b = \frac{\sum xy - N\bar{x}\bar{y}}{\sum x^2 - N\bar{x}^2}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

4. Standardabweichung der Regressionsgeraden:

$$s_b = \frac{s}{\sqrt{\sum x^2 - N\bar{x}^2}}$$

$$s_a = s_b \sqrt{\frac{x^2}{N}}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum (y-Y)^2}{N-2}}$$

$$(y - Y)^2 = \sum y^2 - N\bar{y}^2 - b^2 \left(\sum x^2 - N\bar{x}^2 \right)$$

Mit Hilfe der statistischen Formeln wurden die Regressionsgeraden der einzelnen Messungen sowie die Regressionsgeraden der Standardabweichungen berechnet. Die Berechnungen wurden mit einem mechanischen Tischrechner (Diehl combitron S) ausgeführt und auf ihre Richtigkeit überprüft. Die erhaltenen Eichkurven werden hier zunächst in mathematischer Form aufgeführt und anschließend in den Abbildungen 4 und 5 dargestellt.

b) Eichkurve im neutralen Milieu

$b = + 0{,}069 \qquad a = + 0{,}025$

Somit lautet die Regressionsgerade:

$y = 0{,}069\ x + 0{,}025,$

die Regressionsgeraden der Standardabweichungen:

$y_1 = 0{,}070\ x + 0{,}030$

$y_2 = 0{,}068\ x + 0{,}019$

c) Eichkurve im sauren Milieu

$b = + 0{,}079 \qquad a = + 0{,}017$

Somit lautet die Regressionsgerade:

$y = 0{,}079\ x + 0{,}017,$

die Regressionsgeraden der Standardabweichungen:

$y_1 = 0{,}081\ x + 0{,}024$

$y_2 = 0{,}078\ x + 0{,}009.$

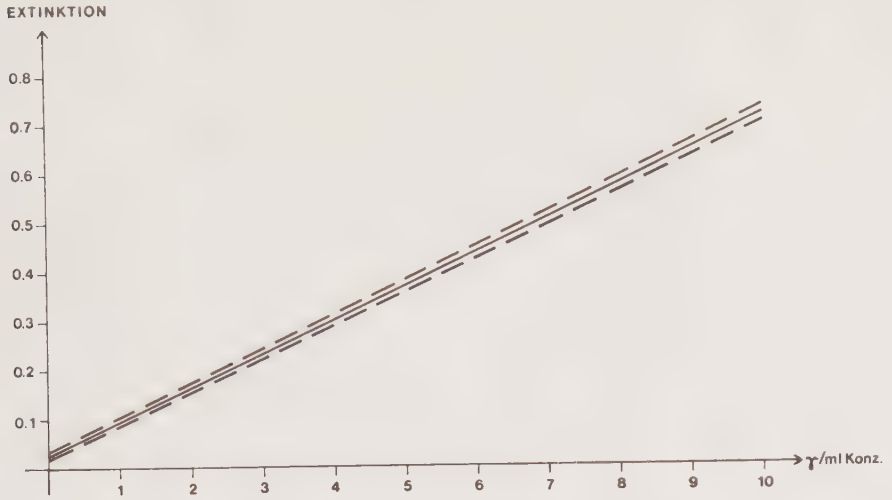


Abb. 4: Regressionsgerade und Regressionsgeraden der Standardabweichungen für 1 bis 10 gamma/ml Medazepam gemessen im neutralen Milieu bei 248 nm

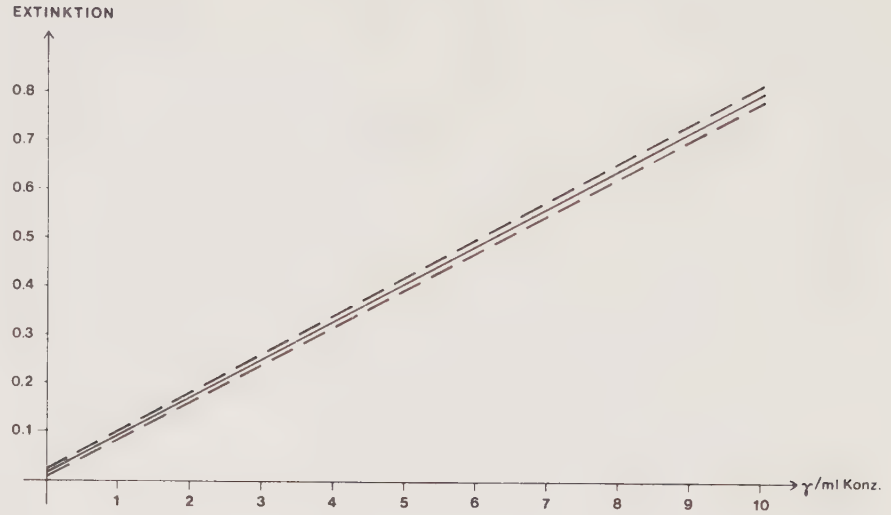


Abb. 5: Regressionsgerade und Regressionsgeraden der Standardabweichungen für 1 bis 10 gamma/ml Medazepam gemessen im sauren Milieu bei 252 nm

2. Hydrolyse-Versuche

Benzodiazepine können durch Säurehydrolyse gespalten und über ihr Benzophenonderivat bestimmt werden. Deshalb wurde auch versucht, Medazepam zu hydrolysieren.

a) mit Salzsäure

Der Inhalt zweier Kapseln Nobrium 10 wurde in ca. 20 ml destillierten Wassers gelöst, mit 2 ml konzentrierter Salzsäure versetzt und eine halbe Stunde im Wasserbad erhitzt. Durch Zusatz von konzentriertem Ammoniak wurde die Lösung alkalisch gemacht und dreimal mit ca. 80 ml Äther ausgeschüttelt. Die gesamte Ätherphase wurde in zwei Hälften geteilt; die eine Hälfte in einer Abdampfschale zur Trockene eingedampft, der Rückstand in 1 ml Methanol aufgenommen und auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen. Als Fließmittel wurde Benzol verwendet. 1-Methylamino-5-chlorbenzophenon (MACB), das in Benzol einen rf-Wert von 0,65 hat, diente als Vergleichssubstanz. Nach Reextraktion der anderen Hälfte mit ca. 10 ml konzentrierter Salzsäure wurde diese im Beckmann-Spektralphotometer gemessen. Sowohl dünnschichtchromatographisch als auch im UV-Spektrum zeigte sich, daß die vorgegebene Reinsubstanz unverändert, also keine Hydrolyse eingetreten war.

In weiteren Versuchen derselben Anordnung, nur mit geringeren Substanzmengen, fand sich bei der dünnschichtchromatographischen Bestimmung, daß ein kleiner Teil der Substanz ins Hydrolysat übergeführt worden war. Eine bessere quantitative Überführung in das MACB gelang auch nicht durch zweistündiges Kochen des Ansatzes unter Rückflußkühlung.

b) mit konzentrierter Schwefelsäure

1 ml (= 2 mg) Medazepam-Base, 10 ml destilliertes Wasser und 5 ml 2n Schwefelsäure wurden zwei Stunden lang unter Rückflußkühlung gekocht, mit konzentriertem Ammoniak alkalisch gemacht, dreimal mit 30 ml Äther extrahiert und der Extrakt zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in ca. 1 ml Methanol gelöst und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Beim Betrachten im UV-Licht von 254 nm zeigte sich, daß ebenfalls nur ein geringer Teil der Reinsubstanz hydrolysiert worden war.

Der gleiche Hydrolyseversuch wurde mit konzentrierter Schwefelsäure durchgeführt. Beim Betrachten der Dünnschichtplatte im UV-Licht bei 254 nm waren mindestens vier Substanzflecken zu erkennen, u.a. ein Fleck in geringer Konzentration, der mit dem rf-Wert von Methyl-amino-chlorbenzophenon im Fließmittel Benzol übereinstimmte.

c) mit Wasserstoffperoxyd

Etwa 10 mg des kristallinen Pulvers der Reinsubstanz wurden in ca. 4 ml destillierten Wassers und 4 ml Salzsäure gelöst und einige Tropfen Wasserstoffperoxyd (30 %) zugegeben. Anschließend wurde dieser Ansatz zwei Stunden lang auf dem Wasserbad erhitzt. Nach Zusatz von konzentriertem Ammoniak bis zu pH 11 wurde dreimal mit ca. 40 ml Äther extrahiert. Die gesammelten Ätherextrakte wurden eingedampft, der Rückstand in etwa 1 ml Methanol aufgenommen und auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen. Als Fließmittel diente Benzol. Im UV-Licht bei 254 nm war zu erkennen, daß die Reinsubstanz in fünf Bruchstücke mit verschiedenen rf-Werten aufgespalten war, u.a.auch in das MACB.

Auf Grund dieser Versuchsergebnisse wurden die Hydrolyse-Versuche von Medazepam eingestellt, da auf dem Wege der Hydrolyse eine quantitative Erfassung nicht zu erreichen war. Die Bemühungen wurden jetzt darauf gerichtet, die Reinsubstanz mit einer möglichst empfindlichen, aber dennoch einfachen Methode nachzuweisen.

3. Dünnschichtchromatographische Versuche

a) Punktförmige Dünnschichtchromatographie

Aus der oben erwähnten methanolischen Stammlösung - 1 mg Medazepam pro ml - wurde 1 ml entnommen und in einem 10 ml Meßkolben mit Methanol bis zur Eichmarke aufgefüllt. Es lag nunmehr eine Standardlösung mit 0,1 mg Wirkstoff pro ml vor. Mit Hilfe einer Blutzuckerpipette (Graduierung 0,01 ml) wurden nun 0,01 bis 0,001 ml, d.h. 1 bis 0,1 gamma Wirkstoff, auf eine Dünnschicht-Fertigplatte (Merck F 254, 0,25 mm) punktförmig aufgetragen (nach STAHL, 1962). Als Fließmittel wurde eine Mischung aus Chloroform und Aceton im Verhältnis 9:1 gewählt. Die Laufstrecke betrug 12 cm.

Im UV-Licht bei 254 nm war eine Fluoreszenzlöschung bis zu einer Konzentration von 0,2 gamma sichtbar. Die unterste Nachweisbarkeitsgrenze nach Auftreten einer Eigenfluoreszenz bei Betrachtung im UV-Licht der Wellenlänge von 366 nm betrug 0,1 gamma. Die gut sichtbaren Grenzen der Substanzflecke wurde angezeichnet, um so eine quantitative Beurteilung unbekannter Substanzflecken durch Fleckenvergleich zu ermöglichen.

b) Präparative Dünnschichtchromatographie

Um die Reinsubstanz von Medazepam nach Extraktion aus biologischem Material von den Begleitstoffen oder seinen Metaboliten trennen zu können, wurden Versuche mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie ausgeführt.

3 ml einer methanolischen Lösung von Medazepam, die 10 gamma/ml enthielten, wurden auf eine Dünnschichtplatte (20:20 cm) mit Glaskapillaren auf eine Startlinie aufgetragen. Die Platte war - wie schon unter A,b beschrieben - präpariert. Der Abstand der Startlinie vom unteren Rand der Platte sowie von den Seiten betrug je 2 cm. Nach Entwickeln in Chloroform-Aceton (9:1) wurde die im UV-Licht (254 nm) dunkelviolett erscheinende Bande angezeichnet, die Kieselgelschicht abge-

kratzt und in einem Reagenzglas mit ca. 4 ml Methanol eluiert. Nach Abfiltrieren wurde das Eluat spektrophotometrisch gemessen. Dabei erschien ein Gipfel von Medazepam.

Der eben beschriebene Versuch wurde wiederholt, allerdings in der Modifikation, daß die abgekratzte Kieselgelschicht mit 4 ml 2n Salzsäure eluiert wurde. Dabei trat sofort eine Gelbfärbung der Lösung auf. Das abfiltrierte Eluat zeigte spektrophotometrisch ein reines Medazepamspektrum. Bei Zusatz kleiner Substanzmengen wurde am Rand der Platte ein Vergleichsfleck der Reinsubstanz höherer Konzentration aufgetragen und die Kieselgelschicht in Höhe des Vergleichsflecks abgekratzt, da bei Konzentrationen von etwa 2 gamma, die präparativ aufgetragen wurden, keine deutliche Fluoreszenzlöschung mehr zu sehen war.

4. Extraktionsversuche

25 mg Medazepam-Base wurden in 25 ml destilliertem Wasser gelöst und durch Zusatz von Weinsäure stark sauer gemacht. Danach wurde dreimal fünf Minuten mit ca. 50 ml Äther im Schütteltrichter geschüttelt, die vereinigten Ätherextrakte mit 20 ml 2 n Schwefelsäure fünf Minuten lang reextrahiert und der Reextrakt spektrophotometrisch gemessen. Die erhaltene Kurve entsprach der Medazepam-Reinsubstanz. Nach der Ätherextraktion wurde nun die wässrige Medazepamlösung durch Zusatz von konzentriertem Ammoniak alkalisch gemacht, dreimal mit ca. 50 ml Äther ausgeschüttelt und die vereinigten Ätherextrakte mit 20 ml 2 n Schwefelsäure reextrahiert. Spektrophotometrisch konnte in diesem Reextrakt ebenfalls Medazepam nachgewiesen werden.

Nach diesen Ergebnissen wurden nun 25 mg Medazepam in 25 ml destilliertem Wasser gelöst, die Lösung mit konzentriertem Ammoniak versetzt, dreimal mit ca. 50 ml Äther fünf Minuten lang ausgeschüttelt und die vereinigten Extrakte mit 2n Schwefelsäure reextrahiert. Die spektrophotometrische Oberprüfung zeigte eine Absorptionskurve, die mit der von Medazepam identisch war.

Zur Prüfung der Frage, ob die Reinsubstanz durch Extraktion und Reextraktion im alkalischen Milieu verändert wird, wurden die schwefelsauren Reextrakte durch Zusatz von 10%iger Natronlauge alkalisch gemacht, dreimal mit Äther extrahiert, der Äther eingedampft und die Rückstände in Methanol aufgenommen. Diese methanolischen Lösungen wurden punktförmig - zum Vergleich wurde ein Fleck der Reinsubstanz mit aufgetragen - auf eine DC-Fertigplatte gebracht, im Fließmittelsystem Chloroform/Aceton (9:1) entwickelt und im UV-Licht betrachtet. Dabei zeigte sich jeweils nur ein Fleck, der der Reinsubstanz entsprach, d.h.,daß die Reinsubstanz bei der Extraktion und Reextraktion nicht verändert wurde.

5. Serumzusatzversuche

a) Extraktionsversuche mit Äther

1 ml der methanolischen Stammlösung von Medazepam (1 mg/ml) wurde 5 ml frischen Rinder-Serums zugesetzt, mit 5 ml destillierten Wassers verdünnt und durch Zugabe von 2 ml 10%iger Natronlauge stark alkalisch gemacht. Dieser Ansatz wurde dreimal mit 30 ml Äther jeweils fünf Minuten ausgeschüttelt, der vereinigte Extrakt mit 20 ml 2n Schwefelsäure reextrahiert und nach Verdünnung mit destilliertem Wasser im Spektralphotometer gegen Schwefelsäure gemessen.

In weiteren Versuchen mit Zusätzen geringerer Medazepam-Dosen bis zu 1 gamma wurde die Methode verbessert und wie folgt standardisiert:

> 3 ml Serum, verdünnt mit 5 ml destillierten Wassers, wurden nach Zugabe von jeweils 1 ml Medazepam-Standardlösungen, die 1 bis 10 gamma/ enthalten, mit 0,2 - 0,3 ml 10%iger Natronlauge auf pH10 bis 11 gebracht und dreimal mit 30 ml Äther ausgeschüttelt. Es ist darauf zu achten, daß sich die beiden Phasen scharf trennen, da

sonst bei der Reextraktion oft Trübungen auftreten, die eine spektrophotometrische Auswertung unmöglich machten.

Die vereinigten Ätherextrakte werden mit destilliertem Wasser gewaschen, über kristallinem Natriumsulfat getrocknet, der Extrakt abdekantiert, der Bodensatz mehrfach mit Äther aufgenommen, wiederum abdekantiert und auf dem Wasserbad in einer Abdampfschale auf ca. 20 ml eingeengt.

Der eingeengte Extrakt wird in einem kleinen spitzen Schütteltrichter fünf Minuten lang mit 1 ml 2n Salzsäure geschüttelt und nach scharfer Trennung der beiden Phasen der salzsaure Reextrakt in einer Mikroküvette im Spektralphotometer gegen den Serumleerextrakt, der analog zu extrahieren und reextrahieren ist, gemessen.

Da bei Vorversuchen mit 2n Schwefelsäure eine Plateaubildung im UV-Spektrum bei 280 nm zu beobachten und auch von den Hydrolyseversuchen her bekannt war, daß Schwefelsäure die Reinsubstanz teilweise verändert, wurde zur Reextraktion 2 n Salzsäure verwendet, da Salzsäure den Wirkstoff selbst unter extremen Bedingungen kaum verändert. In weiteren Versuchen wurde die Ätherphase nach erfolgter Reextraktion mit Salzsäure dünnschichtchromatographisch auf Medazepam geprüft. Dabei zeigte sich auf den Platten kein entsprechender Substanzfleck; die Reextraktion war also quantitativ verlaufen.

b) Extraktionsversuche mit Chloroform

In drei Versuchen wurde zur Extraktion unter sonst gleichen Bedingungen statt Äther Chloroform verwendet. Die Ausbeute war praktisch die gleiche; jedoch war es technisch bedeutend

schwieriger, das kleine Salzsäurevolumen - nur 1 ml - vom spezifisch schwereren Chloroform, das sich im unteren Teil des Schütteltrichters befand, einwandfrei zu trennen.

c) Extraktionsversuche nach Serumfällung mit Perchlorsäure

In zwei Versuchen wurde Medazepamhaltiges Serum, um gegebenenfalls eine höhere Ausbeute zu erreichen, erst nach Fällung mit Perchlorsäure wie folgt extrahiert:

3 ml Serum mit einem Zusatz von 1 ml methanolischer Medazepamlösung - 5 gamma/ml - wurden mit 1 ml 70%iger Perchlorsäure und 2 ml destillierten Wassers versetzt und zehn Minuten lang zentrifugiert (3000 U/min), die flüssige Phase abdekantiert, der Rückstand mit destilliertem Wasser aufgewirbelt, wiederum zentrifugiert und ebenfalls abdekantiert. Die Extraktion des Wirkstoffs mit Äther und die Messung erfolgten wie oben (5. a)) beschrieben. Auf diesem Wege konnten allerdings nur 55 % der vorgelegten Medazepam-Dosen wiedergefunden werden.

d) Aufstellung von Eichkurven

Aus den Meßwerten von 100 Serumextraktionsversuchen wurden Eichkurven aufgestellt und diese in Tabelle 4 und Abb. 6 dargestellt. Die Regressionsgeraden der einzelnen Messungen sowie die Regressionsgeraden der Standardabweichungen wurden mit Hilfe der auf Seite 22 angegebenen statistischen Formeln berechnet.

Eichkurve der Serumzusatzversuche:

$b = + 0{,}070$ $a = - 0{,}001$

Somit lauten die Regressionsgerade:

$$y = 0{,}070\ x - 0{,}001,$$

und die Regressionsgeraden der Standardabweichungen:

$$y_1 = 0{,}071\ x + 0{,}007$$

$$y_2 = 0{,}069\ x - 0{,}009.$$

Berechnung der mittleren Extraktionsausbeute

Der Mittelwert aller Extinktionswerte der Reinsubstanz, gemessen im sauren Bereich ($\bar{y}_{sauer}$), beträgt 0,4536. Der Mittelwert aller Extinktionswerte der Zusatzversuche ($\bar{y}_{Zusatz}$) beträgt 0,3848.

$$\text{Extraktionsausbeute} = \frac{100 \cdot \bar{y}\ \text{Zusatz}\%}{\bar{y}_{sauer}}$$

$$\frac{100 \cdot 0{,}3848}{0{,}4536}\ \%$$

$$= \underline{84{,}8\ \%}$$

Tabelle 4: Zusatzversuche

Zahl der Einzelmessungen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10 gamma/ml
1	0,100	0,155	0,160	0,290	0,340	0,405	0,490	0,640	0,580	0,660
2	0,050	0,100	0,180	0,230	0,325	0,380	0,520	0,570	0,610	0,730
3	0,060	0,150	0,160	0,240	0,330	0,455	0,470	0,540	0,575	0,715
4	0,070	0,080	0,230	0,200	0,370	0,330	0,480	0,450	0,675	0,745
5	0,080	0,110	0,210	0,250	0,350	0,460	0,485	0,500	0,585	0,740
6	0,080	0,165	0,230	0,325	0,370	0,430	0,490	0,630	0,710	0,740
7	0,080	0,190	0,250	0,280	0,360	0,430	0,485	0,625	0,655	0,750
8	0,080	0,160	0,210	0,270	0,380	0,440	0,480	0,550	0,640	0,750
9	0,080	0,160	0,250	0,280	0,325	0,390	0,520	0,555	0,570	0,610
10	0,090	0,150	0,225	0,285	0,340	0,430	0,465	0,580	0,600	0,685
y	0,770	1,420	2,105	2,650	3,490	4,150	4,885	5,640	6,200	7,125
$\bar{y}$	0,077	0,142	0,211	0,265	0,349	0,415	0,489	0,564	0,620	0,713
$s_y \pm$	0,013	0,032	0,032	0,034	0,019	0,038	0,028	0,057	0,045	0,035

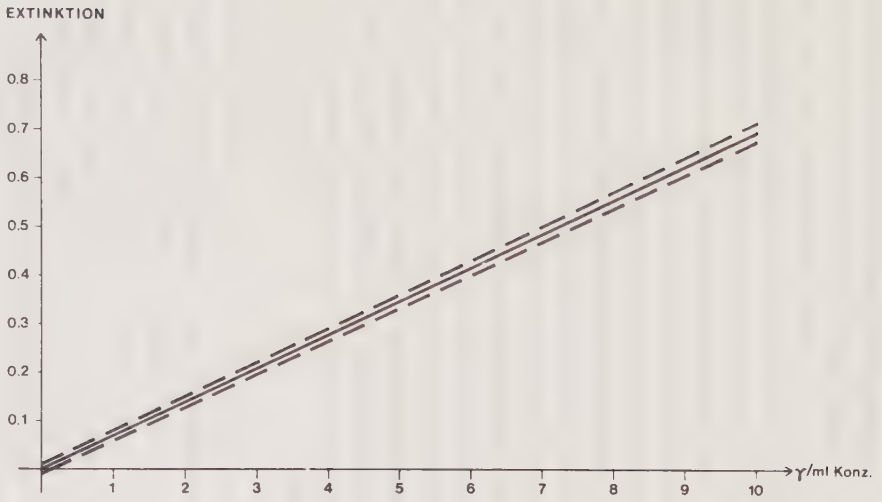


Abb. 6: Regressionsgerade und Regressionsgeraden der Standardabweichungen für Medazepam, gemessen bei 252 nm, nach Zusatz und Wiedergewinnung aus Rinderserum

6. Dünnschichtchromatographie nach Serumextraktion

a) 3 ml Serum, denen 2 gamma Medazepam in methanolischer Lösung zugesetzt waren, wurden in üblicher Weise extrahiert (5. a)) und der gesammelte Ätherextrakt in einer Abdampfschale eingedampft. Der Rückstand wurde in 1 ml Methanol aufgenommen und mit einem Startfleck auf eine DC-Fertigplatte neben einen Vergleichsfleck der Medazepam-Reinsubstanz aufgetragen. Nach Entwicklung im Fließmittel Chloroform-Aceton (9:1) - wobei die Laufstrecke ca. 10 cm betrug - wurde die Platte im UV-Licht betrachtet. Durch den erheblichen Anteil von Serumbestandteilen wanderte das darin enthaltene Medazepam etwas langsamer als der Vergleichsfleck. Ein weiterer Nachteil war, daß nur maximal 1 ml Methanol durch Zwischentrocknung auf einen Fleck aufgetragen werden konnte. Wie eine nochmalige Elution der Abdampfschale zeigte, war auch darin noch Medazepam enthalten, d.h., daß kein quantitativer Obertrag aus der Schale auf die Platte erfolgt war. Bei kleinen Medazepam-Konzentrationen im Plasma sollte aber der Rückstand quantitativ aufgetragen werden können. Darüberhinaus war es schwierig, die Startflecke etwa gleich groß zu halten.

b) Im Hinblick darauf, daß spektrophotometrisch nur Medazepamkonzentrationen bis zu 1 gamma erfaßbar sind, sollten negativ ausfallende Proben im Anschluß an die Messung dünnschichtchromatographisch auf ihren möglichen Gehalt an Medazepam geprüft werden. Zu diesem Zweck wurden Serumextrakte, die nach der in Abschnitt 5, a) beschriebenen standardisierten Methode erhalten worden waren, nach Zusatz von Natronlauge dreimal mit je 30 ml Äther extrahiert, die vereinigten Extrakte auf dem Wasserbad eingedampft, der Rückstand mit 1 ml Methanol aufgenommen, wie

unter a) beschrieben auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen und entwickelt. Die dabei nachzuweisenden Flecken wurden mit solchen bekannter Konzentration verglichen. Da auch auf diesem Weg zum Teil erhebliche Verluste zu beobachten waren, wurde zur Erfassung kleinster Medazepammengen die Methode von CANO (1969) wie folgt modifiziert und in dieser Form bei allen nachfolgenden Untersuchungen angewendet:

> 3 ml Rinderserum mit Zusätzen methanolischer Medazepamkonzentrationen von 0,1 - 1 gamma/ml wurden in der beschriebenen Weise (5. a)) mit Äther extrahiert und die vereinigten Extrakte mit 5 ml 2n Salzsäure reextrahiert. Die Säurephase wurde scharf abgetrennt und durch Zugabe 10%iger Natronlauge auf pH 9 gebracht (der pH-Wert wurde mit Indikatorpapier überprüft), der alkalische Extrakt dreimal mit 15 ml n-Hexan ausgeschüttelt, die vereinigten Hexanphasen auf dem Wasserbad in einer kleinen Abdampfschale eingedampft, der Rückstand erneut in insgesamt 2 ml n-Hexan in vier Schritten, jeweils zu 0,5 ml aufgenommen und auf eine DC-Fertigplatte durch Zwischentrocknung punktförmig aufgetragen. Durch die fraktionierte Aufnahme des Schalenrückstandes wurde dieser praktisch quantitativ erfaßt.

Zur quantitativen Bestimmung des methodischen Verlustes wurde eine Standardlösung von 0,1 mg/ml, wie unter 3. a) beschrieben, hergestellt, hiervon mittels Blutzuckerpipette 0,01 - 0,001 ml, d.h. 1 - 0,1 gamma Wirkstoff auf eine DC-Fertigplatte aufgetragen und mit dem Fließmittel Chloroform/Aceton 9:1 entwickelt. Die hierbei entstehenden Fleckengrößen dienten zum Vergleich mit den Serumzusatzversuchen.

Aus derselben Standardlösung wurden in fünf Versuchen jeweils 1 gamma Medazepam zu 3 ml Rinderserum gegeben und nach der soeben beschriebenen modifizierten Methode nach CANO extrahiert, reextrahiert und auf eine DC-Platte aufgetragen. Dabei wurde streng darauf geachtet, daß die Startflecke möglichst den gleichen Durchmesser hatten. Durch visuellen Vergleich der Substanzflecken nach chromatographischer Trennung mit den Vergleichsflecken wurde der jeweilige prozentuale Verlust bestimmt; er betrug durchschnittlich 40 %.

Zum Nachweis der Medazepam-Reinsubstanz im Serum wurden also zwei Methoden erprobt:

1. Die Extraktion mit anschließender Säurereextraktion und spektrophotometrischer Bestimmung des Reextraktes. Wie die angefertigten Eichkurven ergeben, ist die prozentuale Ausbeute mit 84,8 % recht gut. Ein gewisser Nachteil ist jedoch, daß Medazepam spektrophotometrisch nur bis zu 1 gamma/ml nachzuweisen ist.

2. Die dünnschichtchromatographische Bestimmung, modifiziert nach CANO.
   Die Nachweisbarkeitsgrenze dieser Methode liegt bei 0,1 gamma, die prozentuale Ausbeute ist indes mit 60 % gering. Weiterhin ist bei dieser Methode eine erhebliche Fehlerbreite durch die visuelle Vergleichsschätzung gegeben.

F) Pharmakokinetik

1. Versuchsmodell:

Drei Versuchspersonen, die in letzter Zeit keine Medikamente eingenommen hatten, und die an keiner ernsten inneren Erkrankung litten, wurden an verschiedenen Tagen morgens gegen 07.45 Uhr mittels Braunüle 10 ml Venenblut entnommen. Um 08.00 Uhr erhielten die Probanden unterschiedlich hohe Dosen Medazepam in Form von 3, 5 und 10 Dragees Nobrium zu je 10 mg oral verabreicht. Während des Tages wurde stündlich - am ersten Versuchstag 10 Proben, gerechnet ab der Einnahme - Blut aus der Verweilkanüle entnommen. Weitere Blutentnahmen erfolgten nach 24 und 48 Stunden. Die Probanden aßen und tranken an den Versuchstagen wie gewöhnlich. Alkohol wurde nicht konsumiert.

Die Blutproben wurden jeweils nach einer halben Stunde zentrifugiert, das überstehende Serum abpipettiert, bei Kühlschranktemperatur aufbewahrt sowie innerhalb der nächsten vier Tage aufgearbeitet. Kontrolluntersuchungen des restlichen Serums wurden teilweise eine bis zwei Wochen später durchgeführt.

a) 1. Hauptversuch

männliche Versuchsperson (E.K.), 26 Jahre alt, 70 kg schwer.

Verabreichte Dosis: 10 Dragees Nobrium, d.h. also eine einmalige Einnahme von 100 mg Medazepam.
Subjektiv wurde etwa zwei bis drei Stunden nach Einnahme geringe Müdigkeit empfunden. Insgesamt war die Stimmungslage in dieser Zeitspanne leicht euphorisch.

b) 2. Hauptversuch

männliche Versuchsperson (H.S.), 25 Jahre alt, 71 kg schwer.

Verabreichte Dosis: 5 Dragees Nobrium, also 50 mg Medazepam.
Subjektiv geringe Müdigkeit in den ersten Stunden, ebenfalls geringe Euphorie.

c) 3. Hauptversuch

männliche Versuchsperson (U.V.), 24 Jahre alt, 71 kg schwer.

Verabreichte Dosis: 3 Dragees Nobrium, also 30 mg Medazepam Einzeldosis.
Keine Müdigkeit, keine anderen subjektiven Nebenwirkungen.

2. Bestimmung der Medazepamkonzentrationen in den Seren

a) Spektrophotometrische Bestimmungen (Reextraktionsmethode)

Je nach dem zu erwartenden Gehalt an Medazepam wurden unterschiedliche Serummengen - 5 - 12 ml - so aufgearbeitet wie im Abschnitt 5, a) beschrieben. Das mit Natronlauge versetzte Serum wurde mehrmals mit destilliertem Diäthyläther extrahiert, die Ätherphase über Natriumsulfat getrocknet und mit 2n Salzsäure reextrahiert. Der Reextrakt wurde anschließend gegen einen entsprechend gewonnenen Serumleerextrakt spektrophotometrisch gemessen.

Die gefundenen Extinktionswerte wurden nun in die Gleichung der bei den Zusatzversuchen mit Medazepam-Reinsubstanz erhaltenen Regressionsgeraden eingesetzt, um somit die gemessene Konzentrationen zu bestimmen. Dieser Wert mußte noch durch die untersuchte Serummenge dividiert werden, um die Medazepamkonzentration pro ml

Serum zu erhalten. Durch Einsetzen der Extinktionswerte in die zugehörigen Gleichungen der Regressionsgeraden der Standardabweichungen wurde die methodische Streuung erfaßt. Die Versuchsergebnisse sind in den Tabellen 5 - 7 numerisch und in den Abbildungen 7 - 9 graphisch dargestellt.

b) Dünnschichtchromatographische Medazepambestimmung

Bei zu erwartenden geringen Medazepamkonzentrationen wurden die Seren primär dünnschichtchromatographisch, wie in Abschnitt 6, b) beschrieben, bestimmt. Reextrakte, die im Spektralphotometer nicht mehr meßbar waren, wurden weiter dünnschichtchromatographisch ausgewertet.

Zur Identifizierung des Medazepam im Reextrakt wurde ebenfalls ein Dünnschichtchromatogramm angefertigt. Dabei wurden nebeneinander aufgetragen:

1. Rückstand des Ätherextraktes einer Serumleerprobe in Methanol gelöst.

2. Rückstand des Ätherextraktes eines 7-Stunden-Wertes nach der Einnahme von Medazepam in Methanol gelöst.

3. Säureextrakt eines 7-Stunden-Wertes, erneut alkalisch gemacht und nochmals mit destilliertem Diäthyläther mehrmals extrahiert. Der Äther wurde abgedampft, der Rückstand in Methanol gelöst und aufgetragen.

4. Reinsubstanz der Medazepambase in Methanol gelöst.

Als Fließmittel diente Chloroform/Aceton 9:1. Die Laufstrecke betrug 12 cm.

Bei Betrachten des Chromatogramms im UV-Licht der Wellenlänge 254 nm zeigte sich bei 1 kein Substanzfleck, dagegen bei 2 und 3 ein intensiver dunkler Fleck auf hellem Untergrund (Prinzip der Fluoreszenzlöschung) in einem rf-Bereich von 0,5 - 0,6. Eine Absorption in demselben rf-Bereich zeigte die ebenfalls aufgetragene Medazepam-Reinsubstanz (4 = Kontrolle). Im weiteren fand sich eine äußerst geringe Absorption in einem rf-Bereich von 0,25 sowohl bei 2 als auch bei 3. Es mußte sich hier um einen oder mehrere, in minimaler Konzentration vorhandenen, Metaboliten handeln, der oder die sich - ebenso wie die Reinsubstanz - mit Äther aus alkalischem Milieu extrahieren und aus der Ätherphase mit 2n Salzsäure reextrahieren ließen.

Um zu prüfen, ob sich die Konzentration des Metaboliten mit zunehmendem zeitlichem Abstand von der Einnahme änderte, wurden die Säurereextrakte der Blutproben der ersten Versuchsperson aus der 7. und 9. Stunde nach der Applikation dünnschichtchromatographisch bestimmt. Dabei zeigte sich, daß in zunehmendem zeitlichem Abstand von der Applikation der Metabolit in verschieden hoher Konzentration vorhanden war, wie noch zu beschreiben sein wird. Da Reinsubstanzen von Medazepam-Metaboliten nicht zur Verfügung standen, war es nicht möglich, diesen oder diese Metaboliten näher zu identifizieren. Auf die mögliche Beeinflussung der spektrophotometrischen Messung durch die Metaboliten wird im Anschluß in den einzelnen Versuchsbeschreibungen eingegangen.

3. Beurteilung der Versuche

a) 1. Hauptversuch

1. Die Extinktionswerte der Reextrakte aus den Serumproben während der ersten fünf Stunden waren so hoch, daß sie mit einem weiteren ml 2n Salzsäure verdünnt werden mußten, um im Spektrophotometer gemessen werden zu können.

2. Die Gipfel der Maxima (Reextrakte) lagen nur bei den Proben der ersten drei Stunden exakt bei 252 nm bzw. 251 nm. Bei allen weiteren Bestimmungen bis neun Stunden nach der Einnahme von Medazepam traten unterschiedliche Blauverschiebungen der Gipfel bis 244 nm auf. Dieses Faktum erweckte den Verdacht, daß bei der Reextraktion außer der Reinsubstanz noch ein oder mehrere Metaboliten miterfaßt wurden.
Die Reextrakte der verschiedenen Proben wurden deshalb durch Zugabe von 10%iger Natronlauge alkalisch gemacht, mit Äther extrahiert, in Methanol gelöst und auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen. Zum Vergleich wurde der entsprechend vorbehandelte Serum-Leerwert aufgetragen. Dabei zeigte sich, daß sieben Stunden nach der Medazepam-Gabe außer dem Substanzfleck der Reinsubstanz in minimaler Konzentration (Verhältnis höchstens 1:10) wahrscheinlich eine unbekannte Substanz, möglicherweise mehrere, vorhanden waren. Der rf-Wert dieser Substanz betrug im Fließmittel Chloroform/Aceton (9:1) ungefähr 0,25.
Im Hinblick auf die Blauverschiebungen der Absorptionsgipfel wurden die spektrophotometrischen Meßwerte in Stichproben mit Hilfe der dünnschichtchromatographischen Methode (siehe 6, b)) überprüft, um zu erfahren, ob das bei 244 nm gemessene Maximum dem unveränderten Wirkstoff, dem oder den Metaboliten entspricht oder eine Kombination aus beiden darstellt. Zu diesem Zweck wurden An-

teile der verschiedenen Seren nach entsprechender Extraktion auf Dünnschichtplatten aufgetragen und nach deren Entwicklung die Substanzflecken mit einem rf-Wert zwischen 0,5 - 0,6 durch Fleckenvergleich in ihrer Konzentration bestimmt. Die auf diese Weise gemessenen Konzentrationen entsprechen unter Berücksichtigung des methodischen Fehlers den spektrophotometrisch gemessenen Werten. Wahrscheinlich sind der oder die entstehenden Metaboliten Ursache für die Blauverschiebung des Maximums, auch wenn sie quantitativ kaum in Erscheinung treten.

3. Der 10-Stunden-Wert, der 24- und der 48-Stunden-Wert wurden nur dünnschichtchromatographisch bestimmt.

4. Die Konzentration der unbekannten Substanz mit dem rf-Wert 0,25 war nach 24 Stunden noch deutlich größer als nach 10 Stunden.

b) 2. Hauptversuch

1. Nach einer Stunde war in 5 ml Serum noch kein Medazepam spektrophotometrisch erfaßbar. Der Wert wurde deshalb dünnschichtchromatographisch bestimmt.

2. Nach zwei und nach drei Stunden wurden spektrophotometrisch regelrechte Medazepam-Gipfel gemessen.

3. Das Serum des 4-Stunden-Wertes war etwas hämolytisch; dadurch war der Reextrakt etwas trübe und erst nach fünfminütiger Zentrifugierung spektrophotometrisch meßbar.

4. Nach fünf, sechs, sieben und acht Stunden traten in den Kurven wie beim ersten Hauptversuch wieder Gipfelverschiebungen bis zu 244 nm ein.

5. Die Seren der 9- und 10-Stunden-Werte waren ebenfalls etwas hämolytisch und die Reextrakte so trübe, daß sie selbst nach dem Zentrifugieren spektrophotometrisch nicht ausgewertet werden konnten. Die Werte wurden deshalb dünnschichtchromatographisch bestimmt.

6. Nach 24 Stunden war in 5 ml Serum auch dünnschichtchromatographisch kein Medazepam mehr nachweisbar.

c) 3. Hauptversuch

1. Die Werte der ersten vier Versuchsstunden konnten bei Vorlage größerer Serummengen spektrophotometrisch bestimmt werden.

2. Weiterhin wurden nur die Seren nach sechs, acht und neun Stunden dünnschichtchromatographisch ausgewertet.

3. Nach zehn Stunden war in 10 ml Serum auch dünnschichtchromatographisch keine Medazepam-Reinsubstanz mehr nachzuweisen.

Tabelle 5 Versuch mit 100 mg Nobrium

Stunden nach Applikation	Serummenge in ml	gemessene Extinktion	gamma/ml Serum	dünnschicht-chromatograph. best.Menge in gamma/ml
1	11,6	2,280	2,82	·
2	9,0	2,200	3,49	·
3	12,4	2,300	2,65	·
4	12,0	1,740	2,39	·
5	10,0	0,960	1,37	·
6	10,0	1,160	1,66	·
7	10,0	0,945	1,35	·
8	10,0	0,715	1,02	·
9	10,0	0,560	0,80	·
10	5,0	·	·	0,60
24	4,0	·	·	0,17
48	3,0	·	·	0,08

Tabelle 6 Versuch mit 50 mg Nobrium

Stunden nach Applikation	Serummenge in ml	gemessene Extinktion	gamma/ml Serum	dünnschicht-chromatograph. best.Menge in gamma/ml
1	5,0	·	·	0,12
2	6,0	0,231	0,55	·
3	10,0	0,690	0,98	·
4	3,0	0,100	0,47	·
5	7,5	0,636	1,21	·
6	5,0	0,328	0,93	·
7	7,0	0,390	0,79	·
8	8,0	0,256	0,46	·
9	10,0	·	·	0,16
10	10,0	·	·	0,10
24	4,9	·	·	·

Tabelle 7 Versuch mit 30 mg Nobrium

Stunden nach Applikation	Serummenge in ml	gemessene Extinktion	gamma/ml Serum	dünnschicht-chromatograph. best.Menge in gamma/ml
1	10,0	0,609	0,87	·
2	8,5	0,278	0,47	·
3	5,4	0,161	0,42	·
4	10,8	0,301	0,39	·
5	10,2	·	·	·
6	12,0	·	·	0,100
7	·	·	·	·
8	8,5	·	·	0,140
9	10,0	·	·	0,025
10	10,0	·	·	·

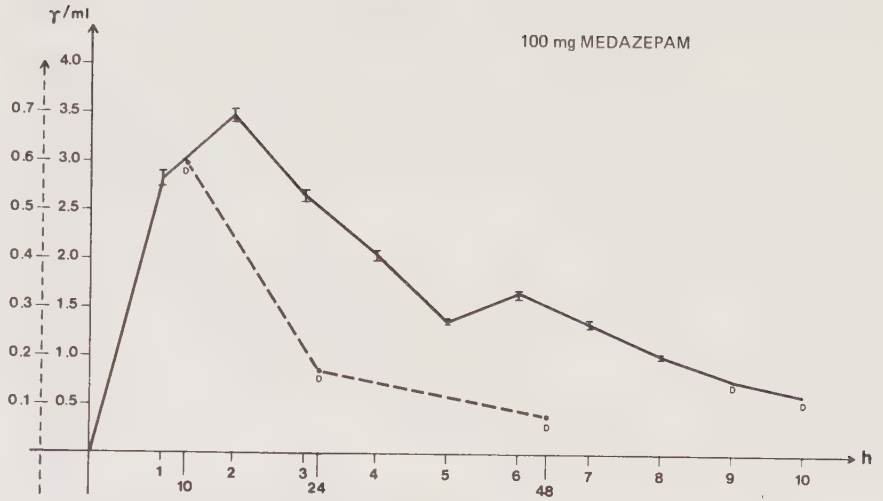
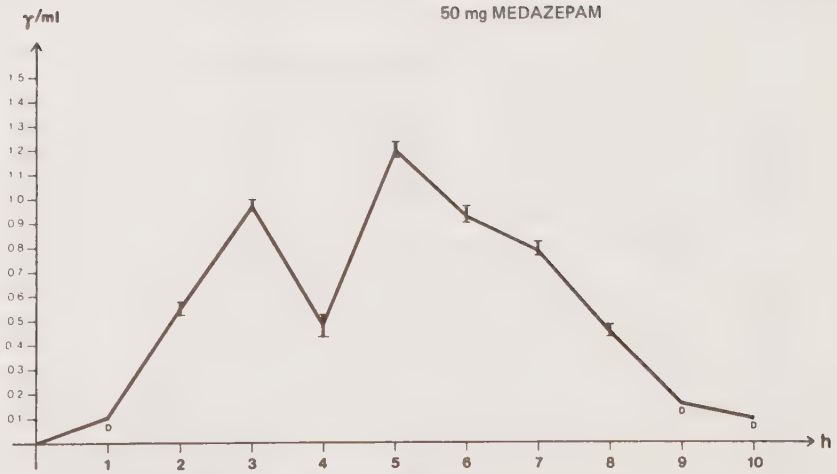


Abb. 7: Blutspiegelkurve nach einmaliger Gabe von 100 mg Medazepam



D = Dünnschichtchromatographisch bestimmter Wert

Abb. 8: Blutspiegelkurve nach einmaliger Gabe von 50 mg Medazepam

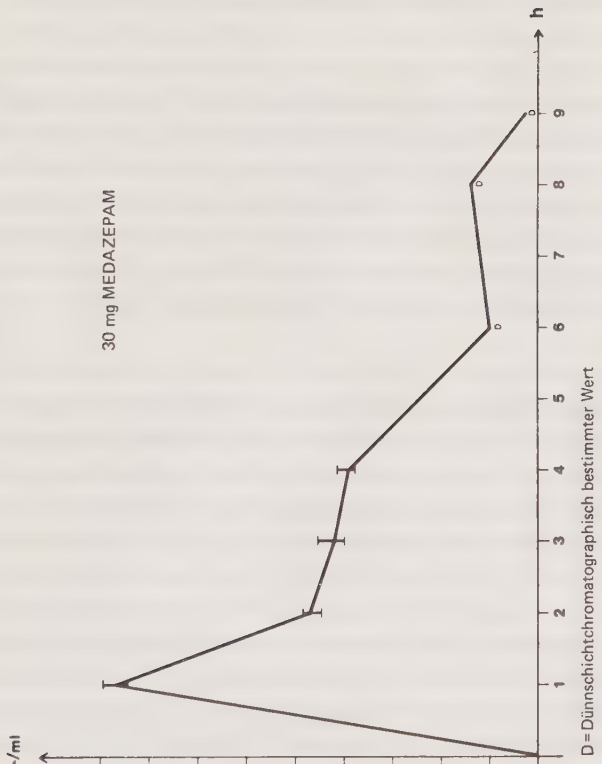


Abb. 9: Blutspiegelkurve nach einmaliger Gabe von 30 mg Medazepam

III. DISKUSSION

Die als Tranquilizer bezeichneten Psychopharmaka, insbesondere die Benzodiazepine, gehören seit Jahren zu den am häufigsten verordneten Medikamenten. Unter den geläufigen Derivaten wie Chlordiazepoxid (Librium), Diazepam (Valium), Oxazepam (Adumbran) und Nitrazepam (Mogadan) ist Medazepam (Nobrium) zur Zeit das jüngste Glied in der Kette.

Im Hinblick darauf, daß durch die Wandlung des Krankheitsbegriffes zahlreiche "Kranke", d.h. in ihrer psychophysischen Leistungsfähigkeit beeinträchtigte Personen, dennoch im wirtschaftlichen Alltag stehen, ist sowohl für forensische als auch für klinisch pharmakologische Fragestellungen die Entwicklung einfacher, jedoch ausreichend genauer mikrochemischer Nachweismethoden zur Erfassung von Wirkungen und Nebenwirkungen von größter Wichtigkeit.

LAUFFER und SCHMID (1969) berichteten über ein spektrofluorimetrisches Verfahren, mit dem noch 10 bis 20 Nanogramm Medazepam nachgewiesen werden können. Mit dieser Methode verfolgten sie bei einer Versuchsperson nach einmaliger Gabe von 30 mg Medazepam Blutspiegelbewegungen über neun Stunden. Sie fanden dabei Werte zwischen 20 Nanogramm und 200 Nanogramm/ml Plasma. CANO (1969) erarbeitete spektrophotometrische, dünnschicht- und gaschromatographische Nachweismethoden für Medazepam, mit denen etwa 50 Nanogramm Wirkstoff zu erfassen sind. Um Aussagen über den Metabolismus und die Pharmakokinetik von Medazepam beim Menschen machen zu können, verwendeten RIEDER und RENTSCH (1969) in Stellung 5 markiertes ^{14}C Medazepam zur quantitativen Bestimmung. Die Proben wurden nach Ätherextration dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und die Eluate der Substanzflecken flüssigkeitsscintillometrisch gemessen.

In den eigenen Versuchen sollte Medazepam zunächst, wie von vielen Autoren für andere Benzodiazepine beschrieben, nach

hydrolytischer Spaltung spektrophotometrisch gemessen werden. Alle diese Versuche, Medazepam quantitativ in sein Benzophenonderivat überzuführen, schlugen jedoch fehl. Deshalb wurden zwei Nachweismethoden für Medazepam - eine spektrophotometrische und eine dünnschichtchromatographische - erprobt und angewandt.

Für die spektrophotometrische Bestimmung wurde aus der kristallinen Reinsubstanz der Medazepambase eine methanolische Stammlösung und aus dieser durch entsprechende Verdünnung wässrige Standardlösung hergestellt, die 1 - 10 gamma Wirkstoff pro ml Lösung enthielten. Die Lösungen wiesen in neutralem Milieu das charakteristische Absorptionsmaximum bei 249 nm und im schwefelsauren Milieu ein solches bei 252 nm auf. Spektrophotometrisch konnten auf diesem Wege Konzentrationen bis zu 1 gamma/ml sicher erfaßt werden. In diesem Konzentrationsbereich waren die Bedingungen des LAMBERT-BEERSCHEN Gesetzes erfüllt. Die Fehlerbreite der Methode betrug 15,2 %.

Obwohl die spektrophotometrische Methode nur mit einer verhältnismäßig geringen Fehlerbreite behaftet ist, erschien sie für die angestrebten pharmakokinetischen Untersuchungen über die Blutspiegelbewegungen nach Gabe therapeutischer Dosen zu grob, zumal die Nachweisgrenzen der bisher bekannt gewordenen, apparativ aufwendigen Methoden im Bereich von 50 bis 100 Nanogramm/ml, d.h. 0,05 bis 0,1 gamma, lagen.

Um empfindlichere Nachweise für Medazepam zu finden, wurden dünnschichtchromatographische Versuche mit Konzentrationen von 0,1 bis 1 gamma Wirkstoff angestellt. Als geeignetes Fließmittel erwies sich das Gemisch Chloroform/Aceton im Verhältnis 9:1. Durch Besprühen der entwickelten Platten mit 50-%iger Perchlorsäure zeigte die Reinsubstanz bei Betrachten im Licht der Wellenlänge 366 nm eine deutliche Eigenfluoreszenz. Die visuelle Nachweisbarkeitsgrenze lag bei 0,1 gamma. Die Fehlerbreite der Methode wurde nicht bestimmt. Jedoch birgt die Methode durch den visuellen Vergleich, den flächenmäßig unvermeidlichen Unterschied der Startflecke, offensichtlich eine relativ große Fehlerbreite in sich.

In hundert Zusatzversuchen wurden optimale Extraktions- und Reextraktionsbedingungen zur spektrophotometrischen Erfassung von Medazepam aus dem Serum ermittelt. Jeweils 3 ml Serum wurden mit destilliertem Wasser verdünnt und durch Zusatz von 10%iger Natronlauge auf pH 10 bis 11 gebracht. Die Extraktion erfolgte durch dreimaliges, jeweils fünf Minuten dauerndes Ausschütteln mit peroxidfreiem Äther. Nach jedem Schritt wurde besonders auf die genaue Trennung der beiden Phasen geachtet. Die vereinigten Ätherextrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet, in einer Abdampfschale auf dem Wasserbad eingeengt und mit 1 ml 2n Salzsäure fünf Minuten lang reextrahiert. Der salzsaure Reextrakt wurde in einer Mikroküvette im Spektralphotometer gemessen.

Zur Bestimmung geringerer Medazepamkonzentrationen im Serum erschien die nach CANO (1969) modifizierte dünnschichtchromatographische Methode am geeignetsten. Extraktion und Reextraktion erfolgten wie im voranstehenden Absatz beschrieben. Der salzsaure Reextrakt wurde durch Zusatz von 10%iger Natronlauge auf pH 9 gebracht und dreimal mit n-Hexan ausgeschüttelt. Die gesammelten Hexanphasen wurden in einer Abdampfschale auf dem Wasserbad eingedampft. Der Rückstand wurde viermal mit 0,5 ml Hexan gelöst und konnte damit praktisch quantitativ punktförmig auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen werden. Es wurde streng darauf geachtet, daß alle punktförmigen Startflecke etwa gleich groß waren. Durch visuellen Vergleich der Substanzflecken mit Eichflecken, die aus einer Verdünnungsreihe der Reinsubstanz aufgetragen wurden, konnte eine quantitative Bestimmung durchgeführt werden. In mehreren Zusatzversuchen wurde der methodische Verlust mit etwa 40 % bestimmt, der damit relativ groß ist.

Mit den beiden beschriebenen Nachweisverfahren wurden bei drei Versuchspersonen, denen einmalige Dosen von 30, 50 und 100 mg Medazepam verabreicht wurden, pharmakokinetische Studien angestellt.

Die Resorption von Medazepam erfolgte sehr rasch, sodaß ein erster Gipfel schon nach wenigen Stunden erschien. Im ersten Versuch (100 mg) war das Maximum der Konzentration zwei Stunden nach der Gabe erreicht, während im Versuch 3 (30 mg) der Gipfel schon nach einer Stunde erschien. Bei der Einnahme von 50 mg Medazepam (Versuch 2) folgte einem ersten Gipfel nach drei Stunden ein noch höherer fünf Stunden nach der Gabe.

Zu entsprechenden Resultaten kamen sowohl RIEDER und RENTSCH (1969) als auch LAUFFER und SCHMID (1969), die maximale Medazepamspiegel eine bzw. zwei Stunden nach der oralen Einnahme beobachten konnten. In ihren Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Medazepam beobachteten RIEDER und RENTSCH bei einer Versuchsperson, daß nur 76,4 % der Substanz resorbiert wurden. Übereinstimmend folgte in allen eigenen Versuchen auf das Maximum ein steiler Abfall der Konzentration bis zu einem gewissen Tiefpunkt, der im Versuch 1 (100 mg) nach fünf, im Versuch 2 (50 mg) nach vier und im Versuch 3 (30 mg) nach drei Stunden erschien. Dies dürfte durch das rasche Einströmen der Substanz in die extravasalen Räume oder aber durch eine schnelle Metabolisierung bedingt sein. In den Versuchen von RIEDER und RENTSCH betrug der Anteil der Radioaktivität des unveränderten Medazepam an der Gesamtradioaktivität nach zwei Stunden ein Viertel, nach weiteren fünf Stunden jedoch nur noch ein Zehntel der Ausgangsdosis, was auf eine schnelle Eliminierung bzw. Metabolisierung der Substanz schließen läßt.

Auf den steilen Abfall der Blutspiegelkurve folgte im ersten Versuch (100 mg) nach sechs Stunden wieder ein geringer Anstieg, der im zweiten Versuch (50 mg) so groß war, daß fünf Stunden nach der Gabe ein zweiter höherer Gipfel auftrat, im dritten Versuch (30mg) jedoch zu einer gewissen Plateaubildung vier Stunden nach der Gabe nur führte. RIEDER und RENTSCH, die die gleichen Blutspiegelbewegungen beobachteten, führten diesen Wiederanstieg auf eine erneute Resorption im Darm zurück, nachdem die Substanz vorher durch die Galle ausgeschieden worden war (entero-

hepatischer Kreislauf). In den folgenden Stunden fielen die Blutspiegel mit nur geringer Schwankung im dritten Versuch relativ konstant schnell ab, sodaß zehn Stunden nach Gabe von 30 mg Medazepam mit den angewandten Nachweismethoden kein unverändertes Medazepam im Serum mehr nachgewiesen werden konnte.

Obwohl die Blutspiegelbewegungen in den eigenen Versuchen mit denjenigen von RIEDER und RENTSCH übereinstimmten, lagen die absoluten Serumwerte in einem anderen Bereich. Während die genannten Autoren bei zwei Versuchspersonen mit Körpergewichten von 100 kg und 55 kg, die jeweils eine Einzeldosis von 30 mg Medazepam erhalten hatten, maximale Serumwerte des unveränderten Medazepam von 116 bzw. 165 ng, LAUFFER und SCHMID bei einer Versuchsperson (49 kg, 30 mg Einzeldosis) einen Medazepamgipfel von 200 ng fanden, lag der Spitzenwert in dem eigenen vergleichbaren Versuch (Versuch 3, 30 mg, 69 kg) bei 870 ng. Entsprechend lagen die Maximalwerte der anderen beiden Versuche bei 3,49 gamma (Versuch 1) und 1,21 gamma (Versuch 2).

Diese Differenzen der absoluten Serumstundenwerte von Medazepam können bisher nicht sicher geklärt werden. Es zeigte sich in den Hauptversuchen bei der spektrophotometrischen Medazepambestimmung eine Verschiebung der Maxima von 252 bis 244 nm. Der Verdacht, daß infolgedessen außer der unveränderten Substanz ein oder mehrere Metaboliten miterfaßt werden, findet eine gewisse Bestätigung, auch wenn die vergleichbaren dünnschichtchromatographischen Kontrollwerte in derselben Größenordnung lagen wie die im Spektrophotometer ermittelten Werte. Die dünnschichtchromatographischen Versuche weisen jedoch darauf hin, daß bei der beschriebenen Extraktion und Reextraktion ein oder mehrere Metaboliten miterfaßt werden. Ihre Konzentration ist allerdings im Zeitraum bis zu zehn Stunden nach der Applikation gering; sie wird erst mit zunehmendem zeitlichem Abstand größer, zumindest bis 24 Stunden nach der Einnahme.

Zu ähnlichen Ergebnissen kam HENZLER (1970) in seiner Arbeit über Chlordiazepoxidbestimmung im Serum. Mit der entsprechenden spektrophotometrischen Methode konnte er bei einem vergleichbaren Versuch mit 100 mg Chlordiazepoxid jedoch maximale Wirkstoffspiegel von rund 5 gamma/ml Serum erfassen und in den Reextrakten einen oder mehrere Metaboliten ebenfalls geringer Konzentration nachweisen, ohne daß dabei auch nur eine geringfügige Verschiebung der Extinktionsmaxima eintrat.

In den beschriebenen Versuchen konnten mit den angegebenen Methoden Blutspiegelbewegungen von Medazepam verfolgt werden. Es zeigte sich jedoch, daß sich diese Methoden nur zur Erfassung relativ hoher Konzentrationen, die nur nach erheblich hoher Dosierung zu erreichen sind, eignen. Da für gerichtsmedizinische Fragestellungen in der Regel therapeutische Dosen zur Beurteilung anstehen, wäre es sinnvoll, empfindlichere Methoden zu entwickeln, die etwa durch gaschromatographische Bestimmungen gegeben wären;dies um so mehr, als zu erwarten ist, daß gaschromatographisch neben dem unveränderten Wirkstoff auch seine Metaboliten sowohl qualitativ als auch quantitativ nachgewiesen werden können.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird über quantitative - eine spektrophotometrische und eine dünnschichtchromatographische - Nachweismethoden von Medazepam berichtet. Außerdem werden Blutspiegelbewegungen nach einmaliger Einnahme von 30, 50 und 100 mg Medazepam beschrieben.

Für die quantitative Bestimmung von reinem Medazepam wurde nach der Extraktion von alkalisiertem Blutserum mit destilliertem Diäthyläther der Ätherextrakt mit 1 ml 2 n Salzsäure reextrahiert und spektrophotometrisch bestimmt. Die spektrophotometrische Nachweisbarkeitsgrenze lag bei 1 gamma pro ml.

In einer nach CANO modifizierten Methode konnte Medazepam dünnschichtchromatographisch erfaßt werden. Die Extraktion und Reextraktion erfolgte wie in Absatz 2 beschrieben. Der Reextrakt wurde mit Natronlauge alkalisch gemacht, mit n-Hexan ausgeschüttelt und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Als Fließmittel wurden Chloroform und Aceton im Verhältnis 9:1 verwendet. Die unterste Nachweisbarkeitsgrenze lag bei 0,1 gamma.

Die pharmakokinetischen Untersuchungen ergaben, daß Medazepam rasch resorbiert und ebenso rasch metabolisiert bzw. ausgeschieden wird; zwischen vier und fünf Stunden nach der einmaligen Gabe sind erneute Anstiege der Blutspiegel zu beobachten.

V. LITERATURVERZEICHNIS

AKERT, K. und HUMMEL, P. — Anatomie und Physiologie des limbischen Systems. Wissenschaftlicher Dienst "Roche" 1963

ALGERI, J. and WALKER, J.T. — Paper chromatographic for identification of the common barbiturates. Amer.J.clin.Path. 22, 37 (1952)

ARMANDO, V.D., JARMA, E.J., FARINA, M.R. — Investigatiôn clínica de un nuevo derivado de las benzodiazepinas en clínica psiquiátrica. Acta Psiquiátrica y Psicológica de América Latina XIV, No.2, 163-165 (1968)

BÄUMLER, J. und RIPPSTEIN, S. — Ober den Nachweis von Methaminodiazepoxid und seiner Metaboliten. Helv.chim.Acta 44, 2208-2210 (1961)

BERG, W. und FLEGEL, H. — EEG-Untersuchung mit Medazepam, einem neuen Benzodiazepin-Derivat. Arzneimittelforsch. 9, 740 (1969)

BERGENER, M. und UNDEUTSCH, D. — Methoden und Probleme der klinischen Psychopharmakologie. Ergebnisse einer Doppelblindstudie mit Medazepam und Placebo in der Alterspsychiatrie. Arzneimittelforsch. 18, 1563-1566 (1968)

BEYER, K.H. und SADEE, W. — Analytische Daten von vier 5-Phenyl-1,4-benzodiazepinderivaten in Monographien Dtsch.Apothekerz. 109, 312-314 (1969)

BIRKMAYER, W. — Indikationen und experimentelle Ergebnisse bei psychopharmakologischen Medikamenten. Hippokrates 37, 3:81-85 (1966)

BRATTON, A.C. und MARSHALL, E.K. — J.Biol.chem.128, 537 (1939)

BURGER, E. — Beeinflussung der Alkoholwirkung durch Librium.
Vortrag, Deutsche Gesellschaft für Verkehrsmedizin, Bad Godesberg, 4.6. - 7.6.1962

CANO, J.P. — Contribution à l'étude pharmacologique et toxicologique du diazèpam ("Valium" N.D.) et de quelques autres benzodiazépines (Application de la chromatographie enphase gazeuse).
Dissertation Marseille 1969

CLAUDE, R., PILLEGAND, G. — Utilité des Tranquillisants en Gastro-Entérologie: intérêt d'un nouveau psychotrope: le Ro 5-4556.
Vortrag 8.Internat.Kongr.f.Gastroenterologie, Prag, 7.7.-13.7.1968

COCHIN, J. and DELEY, J.W. — The use of thin-Layer Chromatography for the analysis of drugs. Identification and Isolation of Phenothiazine, Tranquilizers and of Antihistaminics in bodyfluids and tissues.
J.Pharmacol.Exp.Therap.139,160-165 (1963)

DEGKWITZ, R. — Leitfaden der Psychopharmakologie.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft M.B.H., Stuttgart 1967

DITT, J. — zitiert nach WANDREY-LEUTNER:
Neuro-Psychopharmaca in Klinik und Praxis (2. Auflage)
Schattauer-Verlag, Stuttgart 1967

DOERFEL, K. — Beurteilung von Analysenverfahren und -ergebnissen. Springer-Verlag Berlin/Göttingen/Heidelberg (1962)

DORN,M., HAAG,Th. LANGE-LÜHRS, M. MALLACH,H.J. und WILK, G. — Statistische Untersuchungen über die Beeinträchtigung der Fahrtüchtigkeit durch Alkohol- und Arzneimitteleinwirkungen sowie Alkoholeinfluß und Begleitkrankheiten. Med.Mschr.24,286-291 (1970)

FRANKE, K.-H. — Zur Behandlung von Phobien mit einem neuen Anxiolyticum. Arzneimittelforsch.18, 1570-1571 (1968)

FREUDENBERG, K. — Grundriß der medizinischen Statistik. Schattauer Verlag, Stuttgart 1962

GOLDSTEIN, N. — Experencias clinicas con un ansiolitico nuevo: Ro 5-4556. El Dia Médico Uruguayo XXXIV, 415, 146 (1967)

GORDON, M. — Psychopharmacological agents. A Series of Monographs, Vol.1, 137-224 (1964)

HEINEMANN, H. HARTMANN, A. und STURM, V. — Der Einfluß von Medazepam auf die Schlaf-Wach-Regulation von wachen, unnarkotisierten Katzen. Arzneimittelforsch.18, 1557-1559 (1968)

HENZLER, S. — Über geeignete mikrochemische Nachweismethoden von Chlordiazepoxid (Librium^{R}) und seinen Metaboliten als Voraussetzung für pharmakokinetische Untersuchungen. Inaugural-Dissertation Tübingen 1970

JAIN, N.C., KIRK, P.L. — Systematic applications of Gas-Liquid Chromatography i. Toxicology, IV, The Tranquilizers. Microchem.J.12, 256-264 (1967)

KAMM, G. und BAIER, R. — Nachweis von Chlordiazepoxid und Diazepam in kleinen Blutmengen
Arzneimittelforsch.19, 213-215 (1969)

KAZYAK, L. und KNOBLOCK, E.C. — Application of Gas Chromatography to Analytical Toxicology.
Analyt.Chem.35, 1448-1452 (1963)

KOECHLIN, B.A. and d'ARCONTE, L. — Determination of Chlordiazepoxide (Librium) and of a Metabolite of Lactam Character in Plasma of Humans, Dogs and Rats by a Specific Spectrofluorometric Micro Method.
Analyt.Biochem.5, 195-207 (1963)

KRAKOWSKI, A.J. — A New Benzodiazepine for Treatment of Anxiety-Tension States.
Psychosomatica Vol.VIII, 73-78 (1967)

LABHARD, F. — Die Anwendung von Psychopharmaka in der psychosomatischen Medizin.
in: Fortschritte der Arzneimittelforschung, Band 10, 531 ff., Birkhäuser Verlag Basel 1966

LAUFFER, S. und SCHMID, E. — Dünnschichtchromatographisch-spektrofluorimetrische Bestimmung von 7-Chlor-2,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-1H-1,4-benzodiazepin (Medazepam).
Arzneimittelforsch.19, 740-741 (1969)

LAUFFER, S. und SCHMID, E. und WEIST, F. — Dünnschichtchromatographische Trennung und spektrofluorimetrischer Nachweis psychotroper Pharmaka.
Arzneimittelforsch.19, 1965-1971 (1969)

Mc.LEAN, P.D. — Arch.Neurol.Psychiat.(Chicago)17, 355 (1955)

LEUBE, H. Erweiterung therapeutischer Möglichkeiten durch einen neuen Tranquilizer. Arzneimittelforsch.18,1566-1568 (1968)

LOEWE, S. The Problem of Synergism and Antagonism of Combined Drugs. Arzneimittelforsch.3, 285-290 (1953)

MACEK, K. und VECERHOVA, J. Neues Verfahren der systematischen Analyse von Arzneimitteln durch Papier- und Dünnschichtchromatographie. Pharmazie 20, 605-616 (1965)

MADALENA, J.C. Observacoes Clínicas Preliminares Com Um Nôvo Derivado Benzodiazepínico-O Ro 5-4556. A Fôlha Medica Vol.55, 2, 77-83 (1967)

MALLACH, H.J. Die Beeinflussung der Verkehrstüchtigkeit durch exogene Wirkstoffe. In Gadamers Lehrbuch der chemischen Toxikologie und Anleitung zur Ausmittelung der Gifte. Göttingen, Vandenhoeck und Ruprecht (1969)

M.MARTIN, C., STREET, H.V. Gas-liquid chromatography of submicrogram amounts of drup. I.Preparation, scope and limitation of colums. J.Chromatogr.22, 274-285 (1966)

MEUSERT, W. Vergleichende Untersuchungen mit Nobrium, einem neuen psychotropen Präparat. Med.Welt 30, 1686-1689 (1968)

MOUTINHO, SERGIO DA SILVA Observacoes clínicas preliminares com um nôvo derivado benzodiazepínico: Ro 5-4556 O Hospital Vol.73,5,261-266 (1968)

MUNOZ, J.G. und LEVITAS, A. Über den durch Medikamente und Placebo hervorgerufenen Schlaf. Arzneimittelforsch. 15, 1118-1125 (1965)

OELSCHLAEGER, H. Über das polarographische Verhalten des Chlordiazepoxids (Librium®). Arch. Pharm. 296, 396-403 (1963)

OELSCHLAEGER, H. VOLKE, J., LIM, G.T. und FRANK, U. Zur Analytik des Euhypnicums 1,3-Dihydro-7-nitro-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2on (Mogadan®). 5. Mitteilung: Arzneimittelanalysen mittels Polarographie oder Oszillopolarographie. Arzneimittelforsch. 16, 82-87 (1966)

PAULUS, W., HOCH, W. und KEYMER, R. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen einiger Phenothiazine und ähnlich wirkender Stoffe. Arzneimittelforsch. 13, 609-610 (1963)

PELZER, H. Pharmakokinetik und Metabolismus von 7-Chlor-1,3-dihydro-3-hydroxy-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on und dessen Hemisuccinat beim Menschen. Arzneimittelforsch. 19, 1652-1656 (1969)

PÖLDINGER, W. und SCHMIDLEIN, P. Index psychopharmacorum. Hans Huber Verlag, Bern und Stuttgart 1966

PÖLDINGER, W. Kompendium der Psychopharmakotherapie. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel 1966

PRIBILLA, O. Chlordiazepoxid-Studien zum Nachweis der Ausscheidung beim Menschen. Arzneimittelforsch. 14, 723-733 (1964)

ders. Der gegenwärtige Stand der Nachweismöglichkeit eines Arzneimitteleinflusses bei Verkehrsteilnehmern. Zbl. Verkehrsmedizin 11, 88-100-20 (1965)

ders.	Zum chemischen Nachweis von 1,3-dihydro-7-nitro-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on. Arzneimittelforsch.15, 1148-1152 (1965)
RANDALL, L.O., SCHALLEK, W., SCHECKEL, C., BANZIGER, R. und MOE, R.A.	Zur Pharmakologie des neuen Psychopharmakons 7-Chlor-2,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-1H-1,4-benzodiazepin beim Menschen Arzneimittelforsch.18, 1542-1545 (1968)
REIMER, F.	Vergleichende Untersuchungen über das Wirkungsprofil einiger Benzodiazepin-Derivate. Arzneimittelforsch.18, 1568-1569 (1968)
RIEDER, J.	Methoden zur Bestimmung von 1,3-dihydro-7-nitro-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on und seinen Hauptmetaboliten in biologischen Proben und Ergebnisse von Versuchen über die Pharmakokinetik und den Metabolismus dieser Substanz bei Mensch und Ratte. Arzneimittelforsch.15, 1134-1148 (1965)
RIEDER, J. und RENTSCH, G.	Metabolismus und Pharmakokinetik des neuen Psychopharmakons 7-Chlor-2,3-dihydro-2-methyl-5-phenyl-1H-1,4-benzodiazepin beim Menschen. Arzneimittelforsch.18, 1545-1556 (1968)
SCHOPBACH, R.R.	A Pilot Study with Ro 5-4556 in the Treatment of Anxiety and Depression. Internat.J.Neuropsych.Vol.3,6,494-496 (1967)
SCHWARTZ, D.E., VECCHI, M., RONCO, A. and KAISER, K.	Blood Levels after Administrations of 7-Chlor-1,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-one(Diazepam) in Various Forms. Arzneimittelforsch.16, 1109-1113 (1966)

SCHWEITZER, H. Die visuelle Wahrnehmung bei Kombination von Alkohol mit Valium. Vortrag auf der 1.Tagung der Gesellschaft für gerichtliche Medizin der DDR in Halle (Saale) vom 10.10.-14.10.1967.

De SILVA, SCHWARTZ, M.A., STEFANOVIC,V., KAPLAM,J. and d'ARCONTE, L. Determination of Diazepam (Valium) in Blood by Gas Liquid Chromotagraphy. Analyt.Chem.36,2099 (1964)

SMYTH, D. and PENNINGTON, G.W. The Derection and Excretion of Chlordiazepoxide (Librium^{R}) in Human Plasma and Urine. Arch.Pharm.145, 154-165 (1963)

SMYTH, D., PENNINGTON, G.W. and JACKSON, J. Identification Reactions of Chlordiazepoxide (Librium^{R}) and the Product of Acid Hydrolysis 2-Amino-4-Chlorobenzophenone. Arch.Pharm.145, 147-153 (1963)

SPIEGELBERG, U., PETRILOWITSCH, N. und BETZ, B. Medazepam, ein neuer Tranquilizer: Einfache Prüfung, intraindividuelle Vergleiche und Kombinationstherapie. Arzneimittelforsch.18, 1559-1563 (1968)

STAHL, E. Dünnschichtchromatographie. Springer-Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1962

THOMPSON, H.L. and DECKER, W.J. Analysis of Blood. A Simplified Gas Chromatographie Approach for Toxicologic Purposes. Amer.J.clin.Path.49, 103-107 (1968)

UCER, E. Pilot Study with Ro 5-4556 in Emotionally Disturbed Retarded Children. Curr.Ther.Res.Vol.10,4,187-195 (1968)

VENHOFEN, J.M. und WEISS, D.
Klinische Erfahrungen mit Medazepam bei gastrointestinalen Erkrankungen.
Arzneimittelforsch.18, 1569-1570 (1968)

VIGNOLI, L. und CANO, J.P.
Seperation et identification par chromatographie enphase gazeuse de trois derives de la benzo-f-diazepine 1 - 4.
Bull.Soc.Chim.France 1966, No.5, 1528

WAGNER, H.J.
Vergleichende Untersuchungen über die zahlenmäßige Beziehung zwischen medikament- bzw. alkoholbeeinflußten Verkehrsteilnehmern.
Zbl.Verk.-Med.9, 132-135 (1963)

WANDREY, D. und LEUTNER, V.
Neuro-Psychopharmaca in Klinik und Praxis (2. Auflage).
Schattauer-Verlag, Stuttgart 1967

LEBENSLAUF

Am 14.4.1944 wurde ich, Erwin Kohler, als Sohn des Mechanikers Erwin Kohler und seiner Frau Emma geborene Vogel in Metzingen geboren. Mein Vater starb kurz vor meiner Geburt. In Metzingen besuchte ich die Volksschule und ab 1954 das Gymnasium. Im Februar 1963 legte ich die Reifeprüfung ab und begann im Sommersemester 1963 das Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen. Mein Physikum bestand ich dort im April 1966. Das erste klinische Semester studierte ich in Kiel, das zweite in Wien. Die letzten Semester verbrachte ich wieder in Tübingen, wo ich im August 1969 mein Studium mit dem medizinischen Staatsexamen abschloß.